

MUTAGENITÄT VON CARBAMAZEPIN,
ETHANOL UND CYCLOPHOSPHAMID AN
MENSCHLICHEN PERIPHEREN
LYMPHOZYTEN IN VITRO
VERGLEICH DER WIRKUNG
VERSCHIEDENER METABOLISIERENDER
SYSTEME

INAUGURAL-DISSERTATION

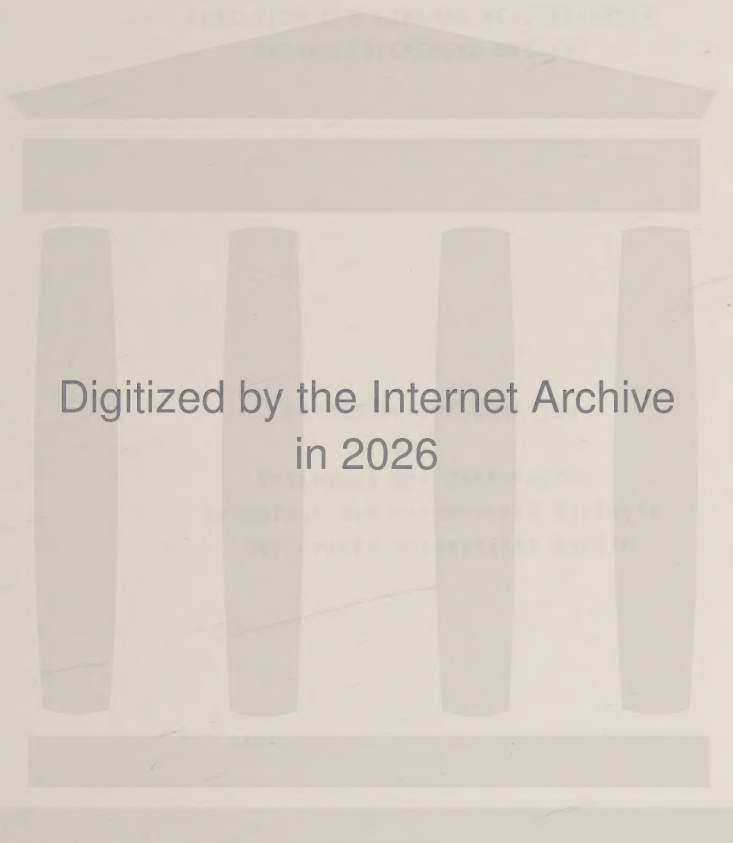
zur

Erlangung der Doktorwürde
vorgelegt dem Fachbereich Biologie
der Freien Universität Berlin

von

Dipl. Biol. Margit Königstein
aus Lich / Oberhessen

1984



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41548817_0088

MUTAGENITÄT VON CARBAMAZEPIN, ETHANOL
UND CYCLOPHOSPHAMID AN MENSCHLICHEN
PERIPHEREN LYMPHOZYTEN IN VITRO
VERGLEICH DER WIRKUNG VERSCHIEDENER
METABOLISIERENDER SYSTEME

INAUGURAL-DISSERTATION
zur
Erlangung der Doktorwürde
vorgelegt dem Fachbereich Biologie
der Freien Universität Berlin

von
Dipl. Biol. Margit Königstein
aus Lich/Oberhessen

Erster Referent: Prof. Dr. G. Obe
Zweiter Referent: Prof. Dr. G. Linnert

Tag der Promotion: 16.11.1984

I N H A L T

	<u>Seite</u>
EINLEITUNG	5
Fremdstoffmetabolismus	8
Strukturverändernde Reaktionen - Phase I-Reaktionen	10
Aufbauende Reaktionen - Phase II-Reaktionen	11
In vivo-Tests	13
In vitro-Tests	14
Kombination von in vivo- und in vitro-Tests	17
Epilepsie	20
Entstehung epileptischer Anfälle	21
Behandlung	21
Mutagenität und Teratogenität von Antiepileptika	23
Carbamazepin und seine Biotransformation	26
Ethanol	30
Disulfiram	33
Cyclophosphamid	34
MATERIAL UND METHODE	38
BrdU-Markierung	39
Rattenleberperfusion	41
Behandlung von Lymphozytenkulturen mit S 9-Mix in vitro	48
Metabolische Aktivierung mit Homogenat aus Schweineleber	52
ERGEBNISSE	56
Rattenleberperfusion	56
Pulsbehandlung mit S 9-Mix	63
Metabolische Aktivierung mit Schweineleber- homogenat	66
STATISTIK	69
ÜBERSICHT DER ERGEBNISTABELLEN	71
ERGEBNISTABELLEN	72

Seite

DISKUSSION	95
Kontrollen	95
Carbamazepin	96
Ethanol	98
Ethanol und Disulfiram	100
Cyclophosphamid	101
Vergleich der Testsysteme	102
SCHLUBBETRACHTUNG	105
ZUSAMMENFASSUNG	107
LITERATUR	108

EINLEITUNG

Die Belastung der Umwelt mit Chemikalien, die in ihrer Zahl ständig zunehmen, erfordern die Untersuchung dieser Substanzen auf ihre Unbedenklichkeit. Ein wichtiger Aspekt ist dabei die Prüfung chemischer Substanzen auf eine mögliche mutagene Wirkung.

Die Induktion von Mutationen ist in Keim- und Somazellen möglich. Keimzellmutationen können an die Nachkommen vererbt werden. Die spontane Häufigkeit struktureller und numerischer Chromosomenmutationen kann durch eine Vielzahl von Substanzen erhöht werden. Etwa 1,2 Prozent aller Neugeborenen weisen solche Mutationen auf (OBE und NATARAJAN, 1980). Eine Erhöhung der Genmutationsrate konnte durch epidemiologische Untersuchungen bisher nicht nachgewiesen werden. Die meisten Genmutationen werden rezessiv vererbt. Sie können über Generationen unentdeckt bleiben und sich in der Bevölkerung akkumulieren. Erst im homozygoten Zustand kommen sie zur Ausprägung (OBE und NATARAJAN, 1980, 1982).

Mutationen in Somazellen werden nicht an die nächste Generation vererbt. Den somatischen Mutationen wird wegen der Erhöhung des Krebsrisikos eine große Bedeutung beigemessen.

Zwischen mutagenen und kanzerogenen Substanzen besteht eine enge Korrelation. Dies konnte für viele Genuß- und Umweltmutagene wie Tabakrauch, Alkohol, Vinylchlorid und Epichlorhydrin nachgewiesen werden (OBE und RISTOW, 1979; HOPKIN und EVANS, 1980; HOGSTEDT et al., 1979; FREUND, 1979). 90 Prozent der kanzerogenen Substanzen erwiesen sich im AMES-Test als mutagen (McCANN et al., 1975; McCANN und AMES, 1976).

Dem Leukozytentestsystem kommt in der Mutagenitätsprüfung eine besondere Bedeutung zu. Es ist die einzige Methode, bei der menschliche Zellen als Testzellen verwendet werden können; die Materialgewinnung ist zudem relativ einfach.

Die kleinen Lymphozyten des peripheren Blutes befinden sich in einem teilungsinaktiven G_0 -Stadium. Sie können in vitro durch mitogene Substanzen (Phytohämagglutinin, Concanavalin A) zur Aufnahme des Zellzyklus und zur mitotischen Teilung stimuliert werden. Auftretende chromosomale Veränderungen sind in der darauffolgenden Mitose mikroskopisch analysierbar.

Die Blutkulturmethode bietet die Möglichkeit, Chromosomen exponierter Personen zu analysieren. Die dabei gewonnenen Ergebnisse lassen sich mit denen von Kontrollpersonen vergleichen. Bei einer Erhöhung der Mutationsrate können Rückschlüsse auf die mutagene Wirkung einer Substanz gezogen werden (in vivo-Test); bei Alkoholikern, Rauchern, therapierten Krebspatienten, strahlenbelasteten Personen und am Arbeitsplatz mit Mutagenen kontaminierten Personen konnte eine Erhöhung von Chromosomenaberrationen nachgewiesen werden (OBE et al., 1980; OBE und HERHA, 1975, 1978; AWA, 1974; OBE und MADLE, 1981; HERHA und OBE, 1974; SRAM et al., 1980).

Zusätzlich bietet das Leukozytentestsystem die Möglichkeit, potentielle Mutagene in vitro zu erfassen. Das Blut eines klinisch gesunden Spenders wird hierbei im Kulturgefäß mit der zu untersuchenden Substanz behandelt. Der Vorteil dieses Tests besteht in der Dosierbarkeit und Kombinierbarkeit von Testsubstanzen. Im Gegensatz zum in vivo-Test können hierbei ohne Zusatz metabolisierender Systeme Stoffwechselprodukte der Testsubstanzen nicht erfaßt werden.

Neben der Analyse von Chromosomenaberrationen stellt die Bestimmung der Häufigkeit von Schwesterchromatidenaustauschen - sister-chromatid-exchange (SCE) - als genetischer Endpunkt eine weitere zytogenetische Testmethode dar.

Wird Bromdesoxyuridin (BrdU) in zwei aufeinanderfolgenden Replikationsphasen anstelle des Thymins in die DNS eingebaut, können mit Hilfe der Fluoreszenz-Giemsä-Färbung (LATT, 1974; PERRY und WOLFF, 1974) einfach- von doppeltsubstituierten

Chromatiden unterschieden werden. Die einfachsubstituierte Chromatide erscheint dunkel, die doppeltsubstituierte Chromatide hell. Austausche zwischen den Chromatiden sind sichtbar und analysierbar.

Die genetische Bedeutung von SCEs ist noch nicht geklärt. SCEs haben offenbar selbst keine genetische Konsequenz, da es sich um reziproke Austausche identischer DNS-Bereiche zwischen Schwesterchromatiden eines Chromosoms handelt.

Die Manifestierung von SCEs ist an die S-Phase gebunden. S-Phase abhängige Mutagene (UV-Strahlen, alkylierende Agenzien) bewirken eine starke Zunahme der SCEs, S-Phase unabhängige Mutagene (ionisierende Strahlen, Bleomycin) beeinflussen die SCE-Rate dagegen nur unwesentlich (PERRY und EVANS, 1975; MUSILOVA et al., 1979; BEEK und OBE, 1975; GEBHART, 1981; NATARAJAN, 1982).

Die Erhöhung der SCE-Frequenz gilt als Resultat von Reparaturprozessen an der DNS während der S-Phase des Zellzyklus (OBE und NATARAJAN, 1980).

Die spontane SCE-Rate liegt beim Menschen zwischen 4 und 8 SCEs pro Mitose (ALHADEFF, 1976; MORGAN und CROSSEN, 1977). Die Spontanrate der SCEs ist vom Blutspender abhängig und bleibt beim gleichen Spender über einen längeren Zeitraum nicht konstant (CARRANO, et al., 1980).

SCEs stellen somit relativ häufige Ereignisse in der Zelle dar. Die mutagene Wirkung einer Substanz kann mit Hilfe der SCE-Methode schon mit Konzentrationen nachgewiesen werden, die keine signifikante Erhöhung der Aberrationsrate induzieren. Für die Analyse von chromosomalen Aberrationen müssen 100 bis 200 Metaphasen ausgewertet werden, während für die Bestimmung der SCE-Rate 20 bis 25 Metaphasen ausreichen.

Der SCE-Test gilt daher als sensitiver Test zum Nachweis mutagener Substanzen (SOLOMON, 1975; STETKA und WOLFF, 1976).

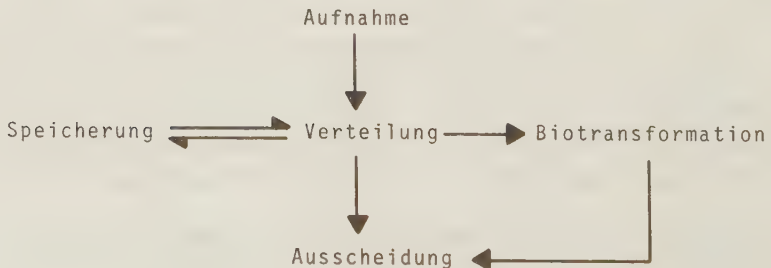
Weitere Einzelheiten und Informationen über Anwendung und Aussagekraft des Leukozytentestsystems und des SCE-Tests sind in Übersichtsarbeiten von OBE und NATARAJAN, 1980; OBE und BEEK, 1982; MÜLLER et al., 1982 und WOLFF, 1982 ausführlich beschrieben worden.

FREM DSTOFFMETABOLISMUS

Mit der Aufnahme von Nährstoffen gelangen auch nichtverwertbare oder nichtausscheidbare (lipophile) Fremdstoffe in den Organismus. Diese mit der Nahrung (Herbizide, Farbstoffe, Konservierungsmittel), als Genußmittel (Tabakrauch, Alkohol) oder als Arzneimittel aufgenommenen körperfremden Substanzen werden durch Stoffwechselreaktionen so verändert, daß sie ausscheidbar sind.

Der Körper besitzt mehrere Organe, die Substanzen metabolisieren können (Niere, Lunge, Milz, Haut, Muskulatur). Der wichtigste und mengenmäßig größte Teil der Biotransformation findet jedoch in der Leber statt (PFEIFFER und BORCHERT, 1978).

Abbildung 1: Schicksal eines Fremdstoffes im Organismus
(verändert nach MUTSCHLER, 1975)



Nach der Fremdstoffaufnahme über Mund, Lunge, Haut, Schleimhaut oder Injektionen erfolgt die Verteilung überwiegend mit dem Blut. Der aktive Übertritt aus der Blutbahn in Gewebezellen hängt ebenso wie die Resorption von verschiedenen Faktoren ab, die

- den Fremdstoff betreffen (Molekülgröße, Eiweißbindung, Löslichkeit, chemische Eigenschaften)
- den Organismus betreffen (Durchblutung einzelner Organe und Gewebe, Membrandurchlässigkeit, pH-Differenz zwischen Plasma und Gewebe).

Die Verteilung von Fremdstoffen wird normalerweise durch ihr Diffusionsvermögen ins Gewebe bestimmt.

Ein anderer Transportmechanismus trifft für lipophile Substanzen zu. Alle biologischen Membranen haben die Eigenschaft, für lipophile Stoffe gut durchlässig zu sein. Lipidlösliche Fremdstoffe können sich in Geweben mit hohem Lipidgehalt anreichern.

Die Leber gehört zu den bestdurchblutetsten Geweben. Ihre Kapillaren haben vergleichsweise große Poren, so daß Fremdstoffe in der Leber in besonders hohen Konzentrationen auftreten. Das lockere Lückenendothel der Sinusoiden, sowie die porenreiche Membran der Parenchymzellen ermöglichen einen intensiven Stoffaustausch.

Die an der Biotransformation beteiligten Enzyme sind hauptsächlich in den Membranen des glatten endoplasmatischen Retikulums (ER) lokalisiert. Sie vermögen Substrate mit sehr unterschiedlicher chemischer Struktur umzusetzen. Es stehen dabei hauptsächlich Reaktionen im Vordergrund, die die Lipidlöslichkeit der Stoffe verringern und sie ausscheidbar machen. Die Struktur der Stoffe wird verändert und damit auch deren Wirkung. Dabei kann aus einem schädlichen Stoff ein unwirksames Abbauprodukt entstehen oder eine reaktions-träge Verbindung zum Schadstoff aktiviert (gegiftet) werden.

Sehr oft wird ein Metabolit erst zur eigentlichen Wirksubstanz (Cyclophosphamid).

Die stoffwechselaktiven Enzyme (mikrosomale Enzyme) werden durch fraktionierte Zentrifugation von Leberhomogenaten gewonnen.

Diese Enzyme können das Substrat mit molekularem Sauerstoff oxydieren und durch Verwendung von Reduktionsäquivalenten - wie NADPH_2 - das verbleibende Sauerstoffatom reduzieren. Aufgrund dieser doppelten Funktion - Oxidation des Substrats und Reduktion von Sauerstoff - werden diese Enzyme auch als mischfunktionelle Oxygenasen bezeichnet. Monooxygenasen übertragen nur ein Sauerstoffatom. Davon zu unterscheiden ist die Oxidation durch Oxidasen, die durch Wasserstoffentzug erfolgt, wie beispielsweise bei der Alkoholdehydrogenase.

Die mischfunktionellen Oxygenasen sind Hämproteine, in denen das Eisen zwischen der zwei- und dreiwertigen Form wechseln kann. Nach der Reaktion mit CO haben die Enzyme ein Absorptionsmaximum bei 450 nm oder 448 nm und werden daher als Cytochrom P-450 oder Cytochrom P 448 bezeichnet. Vom Cytochrom P-450 werden mindestens zwei Typen beschrieben, die als Sauerstoffüberträger dienen (FORTH et al., 1980). Man vermutet, daß es sich bei den mischfunktionellen Oxygenasen um mindestens sieben verschiedene Enzymsysteme handelt, die Fremdstoffe in unterschiedliche Metabolite umformen können (OESCH, 1977).

Es lassen sich zwei Biotransformationsreaktionen unterscheiden: (Zusammenstellung nach FORTH et al., 1980)

Strukturverändernde Reaktionen - Phase I-Reaktionen

Der Fremdstoff wird in seiner Struktur durch Oxidation, Reduktion oder Hydrolyse verändert. Sie werden auch als Transformationsreaktionen bezeichnet. Diese Reaktionen beeinflussen meistens die Wirkung einer Substanz. Man unterteilt:

I. OXIDATIONEN = Übertragung von Sauerstoffatomen

a) NADPH-abhängige, mischfunktionelle Oxidationen
in den Lebermikrosomen

- aromatische Hydroxylierung
- aliphatische Hydroxylierung
- N-Desalkylierung
- O-Desalkylierung
- Desaminierung
- N-Oxidation

b) Dehydrogenierungen = Abspaltung von Wasserstoff-
atomen

- Alkohol-Dehydrogenierung
- Aldehyd-Dehydrogenierung

c) Mono-amin-Oxidationen
-Dehydrierung von Aminen zu Iminen

II. REDUKTIONEN

- Azo-Reduktionen und Nitro-Reduktionen
- Carbonylreduktion

III. HYDROLYSE

= Spaltung von Estern und Amiden durch Enzyme

Epoxide, die als primäre Oxidationsprodukte entstehen, können durch Epoxyhydratasen unter Anlagerung von Wasser in Diole umgebaut werden. Diese Enzyme sind teilweise mit den Monooxygenasen zu Multienzymkomplexen im ER verbunden. Dadurch können für die Zelle schädliche Oxydationsprodukte schnell inaktiviert werden (FORTH et al., 1980).

Aufbauende Reaktionen - Phase II-Reaktionen

In der Phase II der Biotransformation werden unter Beteiligung spezifischer Transferasen energiereiche körpereigene Substanzen an funktionelle Gruppen (Carboxylgruppen, Aminogruppen) gekoppelt. Die funktionellen Gruppen werden

häufig in der Phase I freigelegt oder eingeführt. Die in der Phase II stattfindenden Reaktionen werden auch als Konjugationsreaktionen bezeichnet.

Man unterscheidet:

1. Glucuronidierung
2. Konjugation mit Schwefelsäure
3. Methylierung
4. Acetylierung
5. Konjugation mit Gluthadion
6. Bildung von Dihydrodiol

Nachdem die Fremdstoffe in der Phase I und Phase II der Biotransformation hydroxyliert und konjugiert wurden, verlassen sie die Leber und werden entweder über das Blut in die Nieren transportiert und ausgeschieden oder gelangen über die Galle zum Darm und werden mit den Faeces ausgeschieden.

Enzyminduktion und Enzyminhibition

Verschiedene Fremdstoffe (Barbiturate, Alkohol, 3,4-Benzpyren, Insektizide) -meist gut lipidlösliche Verbindungen- induzieren die vermehrte Synthese der mikrosomalen Enzyme. An Versuchstieren kann gezeigt werden, daß in Leberzellen durch solche Enzyminduktoren das glatte ER zunimmt und das Lebergewicht erhöht wird. Nach einer Enzyminduktion können Pharmaka schneller umgesetzt werden, wodurch oft eine Dosiserhöhung erforderlich wird (MUTSCHLER, 1975; PFEIFER und BORCHERT, 1978).

Es gibt jedoch auch zahlreiche Arzneimittel, die als Enzym-inhibitoren wirken. Sie können die Synthese der im ER befindlichen Enzyme hemmen, sie abbauen oder infolge von Interaktionen mit einem Arzneistoff um die Bindungsstelle der Enzyme konkurrieren (kompetitive Hemmung). Als Enzyminhibitoren gelten Chloramphenicol, Disulfiram, Diäthylstilböstrol.

Im Organismus finden so viele Reaktionen gleichzeitig statt, daß sich trotz bekannter Struktur eines Fremdstoffes nicht immer vorausbestimmen läßt, wie er im Organismus abgebaut wird.

Die meisten Schwierigkeiten bereitet dabei die Übertragbarkeit der Ergebnisse von Versuchstieren auf den Menschen.

Die Unterschiede, die den Metabolismus von Fremdstoffen beeinflussen, können sowohl qualitativ als auch quantitativ sein. Selbst innerhalb verschiedener Zuchtlinien der gleichen Art können im Metabolisierungsmuster ganz erhebliche Unterschiede auftreten. Innerhalb einer Zuchtlinie gibt es noch viele Faktoren, die den Stoffwechsel beeinflussen können. Dazu gehören:

Geschlecht, Alter, Tageszeit, Nahrung, Streß, Wechselwirkung mit anderen Pharmaka, Fremdstoffen oder Enzymsystemen, besondere physiologische Zustände wie Schwangerschaft oder Krankheit (DEWHURST, 1963 a,b; KLINGER, 1973; PFEIFER und BORCHERT, 1978).

Die Tatsache, daß viele reaktionsträge Substanzen im Körper zu aktiven Mutagenen metabolisiert werden können, erfordert die Berücksichtigung der Biotransformation in der Mutationsforschung. Dies führte zur Entwicklung von Testsystemen, die eine metabolische Umwandlung der Testsubstanzen einschließen.

Mit Hilfe dieser Tests konnten viele Promutagene entdeckt werden. Leider gibt es bis heute noch kein 'ideales' metabolisierendes Aktivierungssystem, das alle in vivo-Situationen simuliert. Die Einbeziehung verschiedener Metabolisierungssysteme ist daher für die Prüfung von Substanzen notwendig.

Man unterscheidet:

A) In vivo-Tests: Die Metabolisierung und Wirkung einer Substanz auf die Zellen erfolgt in vivo. Mutationen können entweder an den Test-

zellen des behandelten Tieres (Keimzellen, Knochenmarkszellen, Lymphozyten) oder an deren Nachkommen analysiert werden (Specific-Locus-Test, Dominant-Letal-Test, Drosophila-Test).

- B) In vitro-Tests: Hierbei werden die Substanzen außerhalb des Organismus metabolisiert und wirken auf die Testzellen ein.

Einige Säugerzellen sind auch in vitro zur metabolischen Umwandlung von Chemikalien fähig. Sie können in Kurzzeittests unterschiedlich eingesetzt werden:

- 1) Sie werden selbst als Indikatorzellen verwendet und auf Zellveränderungen, Transformationen, Mutationen, SCEs oder DNS-Repair analysiert. Als Zellen eignen sich Primärkulturen von Ratten-Hepatocyten, Leberepithelzellen, Primär- und Sekundärkulturen von Nagetierembryo-Fibroblasten (MICHALOPOULOS, 1978; NEMOTO et al. 1978; TONG et al., 1981; DEARFIELD et al., 1983; ABE et al., 1983).
- 2) Sie werden mit metabolisch inaktiven Untersuchungszellen (Indikatorzellen) co-kultiviert (CELL-MEDIATED-ASSAY) (KLIGERMAN et al., 1980).

Dieses System wurde als erstes von HUBERMANN und SACHS (1974) beschrieben. Die Verwendung von menschlichen Zellen für die Metabolisierung beschrieben HARRIS et al. (1978) und HSU et al. (1978).

JONES und HUBERMANN (1980) entwickelten einen neuen sensitiven 'Hepatocyten-Mediated-Assay'. Die Hepatocyten wurden dabei nicht durch eine Perfusion, sondern aus Leberschnitten gewonnen. V-79-Zellen des Chinesischen Hamsters wurden mit Rattenhepatocyten co-kultiviert und mit verschiedenen N-Nitrosaminen behandelt. Die Mutagenität einiger Testsubstanzen war mit dieser Methode schon bei einer Konzentration von weniger als 1 µM nachweisbar.

Einen wichtigen Bereich der in vitro-Metabolisierung stellt die zellfreie metabolische Aktivierung von Testsubstanzen dar. Die zur Biotransformation notwendigen Enzyme werden durch Homogenisierung von Geweben und anschließender Zentrifugation gewonnen.

Mikrosomenfraktionen können aus verschiedenen Geweben mit Metabolisierungskapazität gewonnen werden (Leber, Lunge, Niere, Plazenta, Pankreas, Haut, Gehirn). Den Enzymfraktionen aus Leberhomogenaten kommt jedoch eine besondere Bedeutung zu.

Die in vitro-Aktivierung chemischer Substanzen mit Säugetier-Lebermikrosomen ist auf die Wirkung der mischfunktionellen Oxidasen (MFO) zurückzuführen. Andere Bereiche des Lebermetabolismus, in denen auch aktivierende Reaktionen stattfinden können, bleiben jedoch unberücksichtigt (BARTSCH et al., 1982; PFEIFER und BORCHERT, 1978). Die mutagene Wirkung von Substanzen tritt deshalb oft erst bei sehr viel höheren Konzentrationen auf, als bei der Verwendung von intakten Zellen (Hepatocyten; JONES und HUBERMANN, 1980).

Die Verwendung dieses Aktivierungssystems kann auch zu falschen positiven Ergebnissen führen, da Entgiftungsreaktionen nicht stattfinden (FRANTZ und MALLING, 1975).

Der bekannteste Mikrosomentest ist der AMES-Test (AMES et al., 1973, 1975; McCANN et al., 1975). Als Indikatorzellen werden Mikroorganismen - Histidin-Mangelmutanten von *Salmonella typhimurium* - verwendet. Ein Maß für die Mutagenität einer Substanz ist die Anzahl der Bakterienkolonien, die in einem Mangelmedium durch Rückmutation überleben konnten.

Mikrosomentests lassen sich auch mit eukaryoten Zellen als Indikatorzellen durchführen. Eine Schwierigkeit hierbei ist, daß die Mikrosomenfraktion auf Säugerzellen toxisch wirkt (DRAKE et al., 1975). UMEDA und SAITO (1975) verwendeten als erste Säugerzellen als Testzellen in Kombination mit Mikro-

somen zur Aktivierung. CHO-Zellen und V-79-Zellen des Chinesischen Hamsters wurden mit Mikrosomenfraktionen getestet (NATARAJAN et al., 1976; ABBONDANDOLO et al., 1977; KUROKI et al., 1977; KRAHN und HEIDELBERGER, 1977).

BIMBOES und GREIM (1976) entwickelten ein Verfahren, in dem Lymphozytenkulturen 45 Minuten lang einem Aktivierungsgemisch ausgesetzt werden, das die gereinigte Mikrosomenfraktion statt der üblichen postmitochondrialen Fraktion von Leberhomogenaten enthält.

Säugerzellen, speziell menschliche Lymphozyten, haben gegenüber Bakterien den Vorteil, daß mit ihnen auch Chromosomenaberrationen und SCEs analysiert werden können.

Menschliche Lymphozyten reagieren auf S 9-Mix sehr sensitiv. Die direkte Zugabe führt zum Absterben der Zellen oder ist nur für einen kurzen Zeitraum möglich. Dies kann zu falsch-negativen-Ergebnissen führen (TAKEHISHA und WOLFF, 1978).

MADLE und OBE (1977) und MADLE et al., (1978) entwickelten eine Methode, die die Mutagenitätstestung indirekter Mutagene mit dem Leukozytentestsystem erleichtert hat: S 9-Mix oder Grobleberhomogenat werden mit den Co-Faktoren NADP und Glukose-6-Phosphat in sterile Dialyseschläuche abgefüllt und zu den Testkulturen gegeben. Das zu testende Mutagen kann dabei alternativ zu den Kulturen gegeben oder mit der Leberfraktion versetzt werden. Durch die räumliche Trennung wird die toxische Wirkung der Mikrosomenfraktion verhindert. Die Metabolite der Testsubstanz können jedoch auf die Testzellen einwirken.

Der Einsatz von Dialyseschläuchen läßt noch weitere Kombinationsmöglichkeiten zu (MADLE und OBE, 1980; STILLER et al., 1982).

UDENFRIEND-SYSTEM: Als nichtenzymatisches Aktivierungsverfahren katalysiert das UDENFRIEND-System Reaktionen (UDENFRIEND et al., 1954; BRESLOW und LUKENS, 1960), die auch von den MFO

katalysiert werden: aromatische Hydroxylierungen, azyklische Oxidationen, O-Dealkylierungen; N-Demethylierungen und Amino-Oxidationen (PARKE, 1974). Mit diesem System wurden Promutagen in Produkte umgeformt, die in Mikroorganismen und Lymphozyten direkt mutagen wirkten (MALLING, 1966; MAYER, 1971, 1972, 1973; MADLE und OBE, 1978).

C) Kombination von in vivo- und in vitro-Tests: Einige Testsysteme wurden entwickelt, um die Vorteile des in vivo-Tests mit denen des in vitro-Tests zu kombinieren.

Diese Tests haben den Vorteil, daß die Metabolisierungsfähigkeit einzelner Organe oder des gesamten Säugerorganismus genutzt und die genotoxischen Effekte an den Testzellen in vitro untersucht werden können.

Die folgenden Testsysteme wurden entwickelt:

a) Mit dem HOST-MEDIATED-ASSAY, entwickelt von GABRIDGE und LEGATOR (1969), werden die Testsubstanzen und die Testzellen einem Tier injiziert. Die Testsubstanz wird im Wirtstier metabolisiert und wirkt auf die Testzellen ein, die wiedergewonnen werden.

Eine Variante des Systems stellt ein transplazentärer Mutagenitätstest dar, bei dem Embryonen in utero der Testsubstanz ausgesetzt sind. Die Zellen des Embryos werden gewonnen und kultiviert und danach auf Mutationen, Aberrationen oder Transformationen untersucht (INUI und NISHI, 1978).

b) KÖRPERFLÜSSIGKEITEN (Galle, Blut, Urin) oder Stuhlproben enthalten ein breites Spektrum von Metaboliten der Ausgangssubstanz. Stuhlproben oder Körperflüssigkeiten von exponierten Versuchstieren oder Personen können an verschiedenen Testzellen (Bakterien, Hefen, Fibroblasten, Lymphozyten) auf mutagene Effekte untersucht werden (LEGATOR et al., 1978; CONNOR et al, 1979; GABRIDGE et al., 1969; YAMASAKI und AMES, 1977; GUERRERO, 1979; BEEK et al., 1982).

Ein Nachteil bei der Verwendung von Blut ist, daß die Metabolite nur in geringen Konzentrationen auftreten.

Stuhlproben von Nichtvegetariern (Kontrolle: Vegetarier) und weißen Südafrikanern (Kontrolle: schwarze Südafrikaner) wirkten im AMES-Test mutagen. Diese epidemiologischen Untersuchungen korrelieren auch mit dem erhöhten Darmkrebsrisiko dieser Probandengruppen gegenüber den Kontrollgruppen (EHRICH, 1979; REDDY et al. 1980; KUHNLEIN et al. 1981).

Der Urin enthält die wasserlöslichen Metabolite einer Testsubstanz. Der Urin von Cyclophosphamid-behandelten Ratten oder therapierten Krebspatienten, Rauchern und Arbeitern in der Gummiindustrie erwies sich in verschiedenen Testsystemen als mutagen (YAMASAKI und AMES, 1977; GUERRERO et al., 1979; CONNOR et al., 1979; FALCK et al., 1980; AESCHBACHER und CHAPPIUS, 1981, STILLER et al., 1982; KRIEBEL et al., 1983).

Obwohl mit diesem Test keine kurzlebigen Metabolite und Zwischenprodukte des Stoffwechsels erfaßt werden können, gewinnt er in den letzten Jahren immer mehr an Bedeutung. Der Urin-Test ermöglicht die Einbeziehung zumindest eines Teils des Fremdstoffmetabolismus am Menschen in vivo.

c) ORGANPERFUSIONEN werden in der Pharmakologie seit Beginn des Jahrhunderts für Stoffwechseluntersuchungen eingesetzt. Dabei werden vor allem Lunge und Leber als Testorgane verwendet.

Im Gegensatz zu anderen in vitro-Präparationen (Zellfraktionen, isolierte Zellen, Organschnitte) bleibt bei der Perfusion die Funktion des gesamten Organs erhalten. Vorteile dieses Tests sind der Einsatz definierter Testkonzentrationen und Behandlungszeiten. Substanzkombinationen und Ausschluß von Interaktionen mit anderen Organen und Geweben (EXTON, 1975). Hier können die Vorzüge eines in vivo-Tests mit einem in vitro-Test kombiniert werden. Mit der Leberperfusion können Metabolite des Intermediärstoffwechsels, kurzlebige Metabolite und Metabolite der Konjugationsreaktionen (Phase II der Biotransformation)

erfaßt werden.

Die Testsubstanzen werden durch die Leber des Testtieres perfundiert. Das gewonnene Perfusat enthält die durch die Leberenzyme gebildeten Metabolite der Testsubstanz. Eine wiederholte Leberpassage bewirkt die Anreicherung der Metabolite im Perfusat.

Die Leberperfusion kann in der Mutagenitätsprüfung auf zwei verschiedene Arten eingesetzt werden:

- 1) Zellkulturen oder Lymphozytenkulturen werden mit Perfusat behandelt (MADLE et al., 1978; MADLE und OBE, 1980, 1981; RANNUG und BEIJE, 1979; BEIJE et al., 1979, 1984).
- 2) Testzellen können entweder direkt mitperfundiert werden (Salmonella-Zellen; PUEYO et al., 1979) oder mittels Dialyseschlauch in das rezirkulierende Perfusat gegeben werden (Lymphozyten; MADLE und OBE, 1980).

Dimethylnitrosamin, 1,2-Dichlorethan und 1,2-Dibromethan erwiesen sich nach der Aktivierung durch die Leberperfusion an *Salmonella typhimurium* als mutagen (RANNUG und BEIJE, 1979; PUEYO et al., 1979). MADLE und OBE (1981) perfundierten Cyclophosphamid und brachten Blut in Dialyseschläuchen in das Perfusionssystem ein. Nach einer 10 minütigen Behandlungszeit war die SCE-Rate signifikant erhöht.

Weitere Einzelheiten über die Verwendungsmöglichkeiten von metabolisierenden Testsystemen mit eukaryoten Zellen sind nachzulesen bei MADLE und OBE (1980) und Bartsch et al. (1982).

EPILEPSIE

Epilepsie -volkstümlich als 'Fallsucht' und aus der Gesellschaft als 'Heilige Krankheit' bekannt- ist Symptom einer Erkrankung, da die Ursachen wie auch das Erscheinungsbild eines epileptischen Anfalls vielfältig sein können.

Im Gegensatz zum generalisierten Krampfanfall (Grand mal), bei dem das ganze Zentralnervensystem (ZNS) beteiligt ist und der mit Bewußtlosigkeit und Muskelverkrampfungen verbunden ist, sind die Erscheinungsbilder der nicht generalisierten Anfälle von Sitz und Ausdehnung des Herdes im ZNS abhängig. Häufig lösen die kleinen Anfälle einen generalisierten Anfall aus.

Mit Hilfe der Elektroenzephalografie (EEG) können aus den mannigfaltigen Formen der Potentialschwankungen die einzelnen Epilepsieformen differenziert und im Behandlungsverlauf kontrolliert werden. Man kann 39 verschiedene Anfallstypen unterscheiden (MATTHES, 1977).

Epilepsien treten relativ häufig auf. Von 1000 Menschen leiden fünf an chronisch wiederkehrenden Anfällen. Epilepsien sind somit ebenso häufig wie Diabetes mellitus. Rassische oder geografische Unterschiede konnten nicht festgestellt werden (MATTHES, 1977). Auf die Bundesrepublik Deutschland bezogen, müßten demnach 300 000 bis 350 000 Menschen an chronisch wiederkehrenden Epilepsien erkrankt sein. Davon ist etwa 1/3 unter 16 Jahre alt (MATTHES, 1977; JANZ, 1975). Rechnet man die Menschen hinzu, die in ihrem Leben nur einen oder wenige epileptische Anfälle hatten (Gelegenheitskrämpfe), erhöht sich der Wert auf 5 Prozent der Gesamtbevölkerung. In einer epidemiologischen EEG-Studie waren bei etwa 10 Prozent der Versuchsteilnehmer eine erhöhte Disposition zu epileptischen Anfällen nachweisbar (Latente Epilepsien). Das bedeutet, daß jeder zehnte Mensch im Laufe seines Lebens von einem epileptischen Anfall bedroht sein kann (MATTHES, 1977).

ENTSTEHUNG EPILEPTISCHER ANFÄLLE

Die Nervenzellen befinden sich in einem labilen Gleichgewicht von erregenden und hemmenden Einflüssen. Veränderungen dieses labilen Gleichgewichtes führen zu Störungen der Elektrolytenverteilung an den Zellmembranen. Unter bestimmten Bedingungen, z.B. Alkalose (= Erhöhung des Blut-pH-Wertes auf über 7,41) oder Änderungen der Ionenverteilung im Intra- und Extrazellulärraum, können ganze Neuronenverbände abnorm aktiviert werden und zu einer unkontrollierten Entladung führen. Diese Erregbarkeit der Neuronen kann genetisch bedingt sein (5-7 Prozent aller Fälle; HALLEN, 1972), aber auch durch

Hyperventilation (dabei erniedrigt sich die Calcium-Ionen-Konzentration im Extrazellulärraum)

optische Reizung (Rhythmische Lichtblitze)

Übermüdung bei Schlaflosigkeit oder durch

Verabreichung von Pentetrazol (= Stammhirnkonvulsivum, Stimulation von Atem- und Kreislaufzentrum im Gehirn)

provoziert werden (JURNA, 1980). Somit kann unter bestimmten Bedingungen bei jedem Menschen ein epileptischer Anfall ausgelöst werden.

Bei jedem generalisierten epileptischen Anfall werden Nervenzellen geschädigt und sterben ab. Neurone sind im ausgewachsenen Zustand nicht mehr teilungsfähig und werden durch Gliazellen ersetzt (SCHMIDT, 1979). Solche 'Glianarben' begünstigen das Auftreten von Krampfentladungen. Man vermutet, daß die Regulation der Kalium-Ionen-Konzentration aufgrund veränderter Diffusionsverhältnisse gestört ist (SCHMIDT, 1979).

BEHANDLUNG

Zur Verhinderung des 'Einschleifens' epileptischer Anfälle ist es notwendig, diese durch operative Maßnahmen (bei begrenztem Herd im ZNS) oder durch Antiepileptika zu behandeln.

Die Häufigkeiten der operativen Eingriffe zur Beseitigung der Epilepsien ist in den letzten Jahren rückläufig (JANZ, 1975). Ein wesentlicher Grund hierfür liegt in der Entwicklung hochwirksamer Antiepileptika während der letzten Jahrzehnte.

Bei 50 Prozent der Epilepsiepatienten -andere Autoren berichten sogar von 90 Prozent (JURNA, 1980)- läßt sich mit Hilfe von Antiepileptika eine optimale Behandlung erreichen (= Anfallsfreiheit, Sanierung des EEG). In 30 Prozent aller Fälle wird die Häufigkeit und die Intensität gemildert. 20 Prozent aller Fälle sind therapieresistent (MATTHES, 1977).

Ein Antiepileptikum soll die völlige Unterdrückung eines epileptischen Krampfanfalls verhindern, ohne Nebenwirkungen am ZNS oder anderen Organsystemen hervorzurufen. Das Medikament soll auch nach längerer Anwendung seine Wirksamkeit nicht verlieren.

Es gibt derzeit viele Antiepileptika mit unterschiedlichen chemischen Klassifikationen, die zum Teil sehr spezifisch für spezielle Anfallsformen angewendet werden.

Man kennt heute etwa zehn Wirkstoffgruppen mit ganz verschiedenen Wirkmechanismen. Während Barbiturate den Patienten schläfrig machen -sie vermindern die Erregbarkeit der Neuronenmembranen- besitzt Phenytoin eine zentral erregende Wirkung. Es hemmt die synaptischen Erregungsübertragungen, aktiviert inhibitorische Neurone und unterdrückt auf diesem Wege die Krampfaktivität.

Bisher gibt es kein Antiepileptikum ohne Nebenwirkungen. Aus diesem Grunde müssen verschiedene Mittel miteinander kombiniert verabreicht werden.

MUTAGENITÄT UND TERATOGENITÄT VON ANTIEPILEPTIKA

Als Mono- oder Kombinationstherapie müssen Antiepileptika von den Patienten über Jahre -oft ein Leben lang- eingenommen werden.

Von besonderer Wichtigkeit sind daher Untersuchungen, die die mutagenen, teratogenen und kanzerogenen Nebenwirkungen der Antiepileptika erfassen.

Teratogene Wirkungen der Antiepileptika wurden durch Studien von DIETRICH et al.(1980); MAJEWSKI (1980) und JANZ (1980) beschrieben.

Die Plasmakonzentrationen der Antikonvulsiva sind bei Neugeborenen mit denen der Mütter vergleichbar. Es scheint, daß alle Antikonvulsiva diaplazentar auf den Fetus übergehen (DAM und MOURITZEN-DAM, 1980; PAULSON et al., 1979). Aus diesem Grund konnte auch beim Fetus eine Enzyminduktion festgestellt werden (RANE et al., 1975).

Die Häufigkeit größerer Fehlbildungen (Gaumenspalten, Herzfehler) sind bei Kindern von antepileptisch behandelten Personen erhöht, unabhängig davon, ob der Vater oder die Mutter Epileptiker ist (JANZ, 1980). Kleinere Fehlbildungen (unvollkommene Ausbildung der Finger- und Zehenglieder; Hyperplasie des Mittelgesichtes) wurden ausschließlich bei Kindern antiepileptisch behandelter Mütter beobachtet und können auf die Behandlung zurückgeführt werden. Diese Befunde sind unabhängig vom verabreichten Medikament (DIETRICH, et al., 1980; MAJEWSKI, 1980). Die Frage, ob kleine Anomalien rein teratogene Erscheinungen sind, wird jedoch unterschiedlich diskutiert (JANZ, 1980).

In der Muttermilch sind Antikonvulsiva nachweisbar; die Konzentrationen sind hier jedoch nicht so hoch wie im Plasma (DAM und MOURITZEN-DAM, 1980; BRANDT, 1976).

Über die mutagene Wirkung von Antiepileptika gibt es bei in vivo-Analysen bisher widersprüchliche Befunde. Die Ergebnisse von in vitro-Analysen waren durchweg negativ. OBE et al.(1980) geben einen Überblick über bisherige Mutagenitätsbefunde von Antiepileptika.

Chromosomenuntersuchungen von Epileptikern, die mit Carbamazepin (CBZ) und Diphenylhydantoin (DPH) in Monotherapie behandelt wurden, zeigten eine höhere Rate struktureller Aberrationen gegenüber den Kontrollpersonen. CBZ-behandelte Patienten wiesen eine Erhöhung der Chromatidentranslokationen (RB') auf und DPH-behandelte Patienten eine Erhöhung von Dizentrischen Chromosomen. Bei Patienten unter Kombinationstherapie mit CBZ wurden die gleichen Ergebnisse beobachtet. Die mit CBZ und DPH behandelten Probanden hatten ausschließlich eine Erhöhung von Dizentrischen Chromosomen. Mit CBZ und Primidon behandelte Epileptiker wiesen darüberhinaus eine Erhöhung von Chromatidentranslokationen und Ringchromosomen auf (HERHA und OBE, 1976, 1977). Diese Befunde ließen auf eine substanzspezifische Aberrationsinduktion schließen.

Die Diskrepanz der teils positiven in vivo-Ergebnisse zu den durchweg negativen in vitro-Ergebnissen läßt vermuten, daß es durch Metabolisierung der Ausgangssubstanz im Körper zu einer indirekten Mutationsauslösung durch Metabolite kommt.

Sind die Metabolite in Reinsubstanz verfügbar, können sie einzeln in Lymphozytenkulturen getestet werden.

Chromosomenuntersuchungen im in vitro-Leukozytentestsystem mit fünf Metaboliten des CBZ führten zu keiner Erhöhung der Aberrations- und SCE-Rate (KÖNIGSTEIN et al, 1984). Die Ergebnisse sind aus Abbildung 2 ersichtlich (Seite 25).

Mit dieser Methode können nur die zur Verfügung stehenden Metabolite getestet werden. Von CBZ wurden mit Hilfe chromatographischer Verfahren dreizehn verschiedene Metabolite im Urin nachgewiesen. Der Urin enthält jedoch nur die wasserlöslichen Metabolite.

Im Körper können aber

1. andere Mengenverhältnisse der im Urin gefundenen Metabolite vorliegen
2. nicht wasserlösliche Metabolite gebildet werden
3. kurzlebige Zwischenmetabolite entstehen
4. Interaktionen der Metabolite auftreten, die in vitro nicht nachweisbar sind.

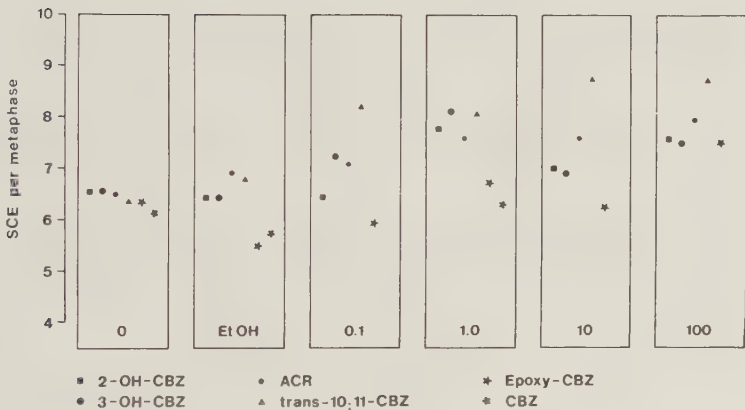


Abbildung 2: SCE-Häufigkeiten von Carbamazepin und fünf seiner Metabolite: 2-OH-Carbamazepin (2-OH-CBZ), 3-OH-Carbamazepin (3-OH-CBZ), 9-Hydroxy-methyl-10-carbamyl-acridan (ACR) trans-10,11-di-OH-10,11-di-H-Carbamazepin (trans-10,11-CBZ) und 10,11-Epoxycarbamazepin (Epoxy-CBZ) in menschlichen Lymphozyten in vitro

Die Bezugsgröße 1,0 stellt die im menschlichen Urin gefundene Konzentration der jeweils getesteten Substanzen dar: 2-OH-CBZ = 0,5 µg/ml; 3-OH-CBZ = 0,5 µg/ml; ACR = 0,5 µg/ml; trans-10,11-CBZ = 1,6 µg/ml; Epoxy-CBZ = 0,4 µg/ml; CBZ - Plasmakonzentration = 10 µg/ml

CARBAMAZEPIN (CBZ) UND SEINE BIOTRANSFORMATION

Das hier untersuchte Antiepileptikum Carbamazepin (Tegretal(R)), wurde 1957 von W. Schindler synthetisiert und wird seit Anfang der sechziger Jahre zur antiepileptischen Therapie und zur Behandlung der Trigeminusneuralgie eingesetzt.

In der Struktur von CBZ sind Elemente der klassischen Antikonvulsiva (Barbiturate, Hydantoine, Benzodiazepine) und der polyzyklischen Psychopharmaka vereinigt.

CBZ wird im Körper zu 95 Prozent verstoffwechselt. Nur 5 Prozent der Ausgangssubstanz wird unverändert mit dem Urin ausgeschieden (FAIGLE et al., 1976).

Die größte Reaktionsfähigkeit besitzt das Molekül an der C = C -Doppelbindung.

Bedingt durch das trizyklische Grundgerüst ist CBZ stark lipophil. Bereits eine Minute nach intravenöser Applikation konnte an Dünnschnitten CBZ in allen Geweben und Organen des Testtieres (Maus) nachgewiesen werden (FAIGLE et al., 1976).

Der Organismus besitzt keinen Mechanismus, lipophile Substanzen unverändert auszuscheiden. Die Ausscheidung erfolgt durch Metabolisierung zu hydrophilen Metaboliten.

Wie aus Abbildung 3 (Seite 27) ersichtlich ist, kann die Metabolisierung von CBZ auf zwei unterschiedlichen Wegen erfolgen:

1. Epoxidation durch Addition eines Sauerstoffatoms
 an der 10,11-Position des Moleküls
2. Hydroxilierung in einem der zwei aromatischen Ringe

Der anteilmäßig wichtigere Weg scheint die Epoxidation zu sein (FAIGLE et al., 1976; OESCH, 1976).

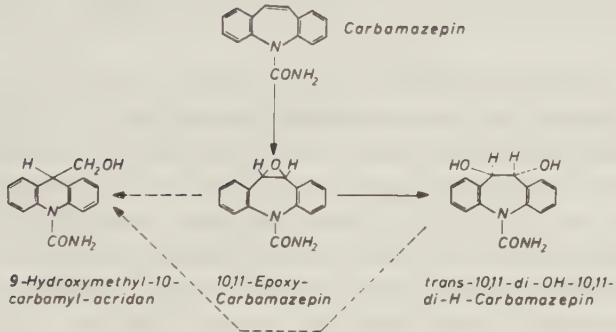
Epoxycarbamazepin zeigte im Tierexperiment eine ähnlich antikonvulsive Wirkung wie Carbamazepin selbst (GAGNEUX et al., 1975). Es ist daher anzunehmen, daß das Epoxid zur therapeutischen Wirkung von Carbamazepin beiträgt.

Abbildung 3:

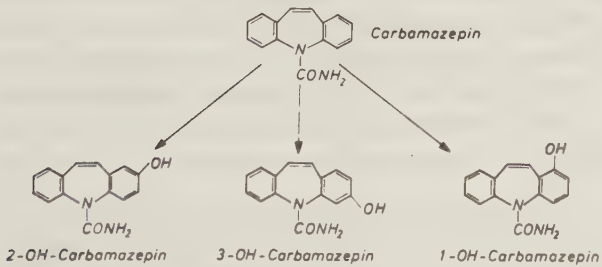
Die Biotransformation von Carbamazepin

(aus FAIGLE et al., 1976)

EPOXIDATION



AROMATISCHE HYDROXYLIERUNG



Die Epoxidation wird durch Mono-Oxygenasen und die Ringöffnung durch eine Epoxyhydrase, beides mikrosomale Enzyme, katalysiert (FAIGLE et al., 1976). Nicht geklärt ist, ob die Ringkontraktion, die über unbekannte Zwischenstufen zum Metaboliten 9-Hydroxy-methyl-acridan führt, enzymatisch oder spontan verläuft.

Epoxide sind eine heterogene Klasse von Verbindungen, die hinsichtlich ihrer elektrophilen Reaktivität, Stabilität und molekularen Struktur variieren können (GLATT et al., 1975).

Epoxide besitzen eine oder mehrere Alkylgruppen und werden in die Gruppe der alkylierenden Agenzien eingeordnet (ROSS, 1962). Die Fähigkeit, 'Cross-links' zu induzieren, ist für Epoxide bekannt (VAN DUUREN et al., 1963). Wie für andere Alkylantien sind die Purinbasen der DNS, speziell Guanin und die Phosphatgruppen an der DNS die bevorzugten Reaktionspartner (JERINA und DALY, 1974). Mit Proteinen und RNS können Epoxide ebenfalls Verbindungen eingehen (WHEELER, 1962; MELZER, 1967).

Epoxide sind somit potentielle Mutagene und Karzinogene. Für einige Epoxide (Styrenoxid, Äthylenoxid, 1,2,3,4-Diepoxybutan, Epichlorhydrin) konnten mutagene und karzinogene Aktivitäten mit verschiedenen Testsystemen nachgewiesen werden (McCANN et al., 1975; VAN DUUREN et al., 1965, 1966; EHRENBURG und GUSTAFSSON, 1957; EHRENBURG und HAUSSAIN, 1981; OBE et al., 1982; KLINE et al., 1982; ROSSI et al., 1983).

Die Stärke der mutagenen Wirkungsweise von Epoxiden hängt offenbar von der Lage des Epoxidrestes an der chemischen Grundstruktur ab (WADE et al. 1979). WADE et al. (1978) untersuchten verschiedene Epoxide im Salmonella/Mikrosomentest. Sie fanden, daß monosubstituierte Epoxide (3,3,3-Trichloropropylen-oxid, Propylenoxid, Styrenoxid, 2,3-Epoxybutan) die höchste mutagene Aktivität aufwiesen, wobei schon eine einfache Methylgruppe am Oxiranring die Mutagenität reduzieren

oder ganz eliminieren kann.

Für 1,2-substituierte Verbindungen scheinen nur die cis-substituierten, aber nicht die trans-substituierten Verbindungen aktiv zu sein. Tetrasubstituierte Verbindungen zeigten nach OESCH (1974) und WADE et al. (1978) keine mutagene Aktivität.

Das in dieser Arbeit untersuchte 10,11-Epoxy carbamazepin ist ein 1,2-cis-substituiertes Epoxid und gehört somit in die Gruppe der potentiell mutagen wirkenden Epoxide.

GLATT et al. (1975) fanden für 10,11-Epoxy carbamazepin im Salmonella/Mikrosomentest nach AMES et al. (1975) keine mutagene Aktivität. Zwei weitere 10,11-substituierte Epoxide, Cyproheptadin-10,11-oxid und Cyclobenzaprin-10,11-oxid, waren ebenfalls nicht mutagen.

GLATT et al. (1975) testeten CBZ in den Konzentrationen 30 und 100 µg/Platte und Epoxy-CBZ in den Konzentrationen zwischen 1 und 500 µg/Platte im Salmonella/Mikrosomentest. Für beide Substanzen wurden keinerlei Hinweise für eine mutagene Aktivität gefunden.

10,11-Epoxy carbamazepin unterliegt -wie viele andere metabolische Zwischenprodukte- einer weiteren Metabolisierung im Körper. Zwei dieser metabolischen Endprodukte konnten im Urin nachgewiesen werden. Neben diesen von FAIGLE et al. (1976) gefundenen wasserlöslichen Endmetaboliten könnten im Körper vorliegende Zwischenmetabolite unentdeckt geblieben sein.

Die phenolischen Metabolite von CBZ werden durch Oxygenasen in der Leber katalysiert (FAIGLE et al., 1976).

Stark polare, nicht glucuronidhaltige Metabolite konnten noch nicht chemisch analysiert werden. Die bisherigen Befunde lassen aber vermuten, daß Acridinderivate und Iminostilben nicht oder nur in unbedeutendem Maße weitermetabolisiert werden (FAIGLE et al., 1976).

ETHANOL

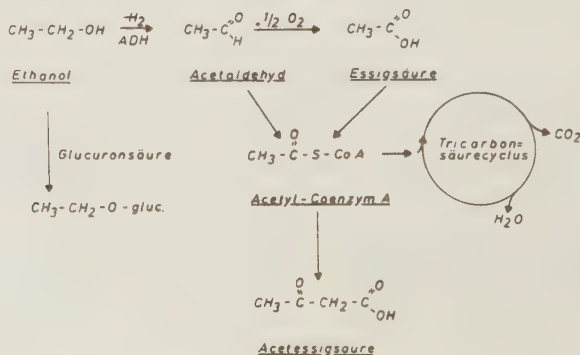
Ethanol wurde als Lösungsmittel für die getesteten Substanzen verwendet und wurde auch allein getestet.

METABOLISMUS VON ÄTHYLALKOHOL

Ethanol wird in der Leber von dem Enzym Alkoholdehydrogenase (ADH) oxidiert. Die ADH ist NADH-abhängig und hat Zink als katalytisches Zentrum. Der durch ADH gebildete Acetaldehyd wird durch das Enzym Aldehyddehydrogenase zu Essigsäure weiteroxidiert. Die anfallende Essigsäure wird zum Teil über die Aktivierung mit Coenzym A zu Synthesen im Intermediärstoffwechsel verwendet oder im Tricarbonsäurezyklus in CO_2 und H_2O aufgespalten (HENSCHLER, 1980; LIEBER, 1976).

Neben diesem Hauptmetabolisierungsweg, der beim Menschen 90 bis 96 Prozent beträgt, werden 3 - 8 Prozent über das Cytochrom-P-450-abhängige Enzymsystem der Monooxygenasen (MEOS = Microsomal Ethanol Oxidizing System) zu Essigsäure oxidiert. Andere Autoren schätzen den Anteil des MEOS auf 10 - 20 Prozent (WELLHÜNER, 1976). 0,51 Prozent des Ethanols werden direkt glucuronidiert (HENSCHLER, 1980) und mit dem Urin ausgeschieden.

Abbildung 4: Metabolismus von Ethanol



Ethanol ist als Genuß- und Suchtmittel weit verbreitet. Diese Tatsache gab Anlaß, den Ethanol auf seine mutagene Wirkung zu überprüfen. Dabei zeigte sich, daß Ethanol in fast allen Testsystemen, die den Stoffwechsel einbezogen, mutagen war. In Testsystemen, die den Stoffwechsel nicht berücksichtigten, hatte Ethanol keinen mutagenen Effekt.

Die mutagene Wirkung des Ethanols wurde in vielen Mutagenitätstestsystemen an verschiedenen Zelltypen untersucht. Eine Übersicht gibt die nachfolgende Tabelle:

Tabelle 1: Mutagenitätsbefunde mit Ethanol

Testorganismus oder Testzellen	Aberrationstyp	Literatur
Pilze	mitotisches Crossing over + Aneuploidien	HARSANYI, et al., 1977
Vicia faba	Chromatidenaberrationen	RIEGER und MICHAELIS, 1960 b, 1961 a,b; 1970, 1972; RIEGER et al., 1975
	SCEs	SCHUBERT, et al., 1979
Allium cepa	Chromatidenaberrationen	SAX und SAX, 1966
Mais	Meiose: Paarungs- und Verteilungsstörungen von Chromosomen	MAGUIRE, 1975
Grashüpfer (Phloeba antennata)	Meiose: Brüche im X-Chromosom	MANNA und MAZUMDER, 1964
CBA- Mäuse	Dominant-Letal-Mutationen	BADR und BADR, 1975 BADR et al., 1977
Mäuse (Knochenmarks- zellen)	SCEs	OBE et al., 1979b
Mäusefeten (Leberzellen)	SCEs	ALVAREZ et al., 1980
Wistar-Ratten	SCEs	TATES et al., 1980

Fortsetzung Tabelle 1:

Testorganismus oder Testzellen	Aberrationstyp	Literatur
menschliche Lymphozyten	Chromatidenbrüche SCEs	BREGMANN, 1971 ALVAREZ et al., 1980
menschliche Fibroblasten	Chromatidenbrüche	MEISNER et al., 1970 MEISNER und INHORN, 1972

Tabelle 2: Mutagenitätsbefunde mit Acetaldehyd

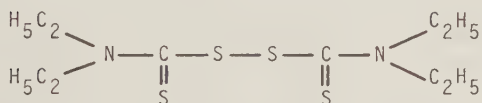
Testorganismus oder Testzellen	Aberrationstyp	Literatur
Vicia faba	Chromatidenaberrationen	RIEGER und MICHAELIS, 1960 a
Drosophila melanogaster	rezessive Letal-Muta- tionen	RAPOPORT, 1948 GRAETSCHER unveröffentl.
Mäuse (Knochenmarks- zellen)	SCEs	OBE et al., 1979 b
Chinesischer Hamster (Knochenmarks- zellen)	SCEs	KORTE et al., 1981
Ratten (Fibroblasten)	Chromatidenaberrationen + Mikrokerne	BIRD et al., 1982
CHO-Zellkulturen	SCEs	OBE und BEEK, 1979 OBE und RISTOW, 1977

Die Untersuchungen ergaben, daß nicht Ethanol, sondern der Acetaldehyd für die mutagene Wirkung verantwortlich war. Die

Acetaldehydkonzentration im Blut kann nach stärkerem Alkoholkonsum 10 - 45 μM betragen (KORSTEN et al., 1975). Acetaldehyd induziert Crosslinks in der DNS. In der S-Phase können derartige DNS-Schäden als Folge von Fehlern während der Replikation zu Chromatidenaberrationen (Mis-replication) oder nach erfolgtem DNS-Repair zu einer Erhöhung der SCE-Rate führen.

Zytogenetische Untersuchungen an Alkoholikern zeigten eine signifikante Erhöhung chromosomaler Veränderungen (OBE und HERHA, 1975; OBE 1981; LILLY, 1975).

DISULFIRAM (Antabus^(R)) oder Tetraäthylthiuram



Arbeiter, die bei der Polymerisation von Gummi Kontakt mit dem Vernetzungsmittel Tetraäthylthiuramsulfat hatten und nur geringe Mengen Alkohol tranken -etwa eine Flasche Bier- hatten charakteristische Krankheitserscheinungen:

starke Hautrötungen an Kopf, Schultern und Brust;
Hitzegefühl; starke Kopfschmerzen; intensives Unwohlsein; Herzklopfen bei gleichzeitigem Blutdruckabfall bis zum Kreislaufkollaps; Atemsteigerung, die bis zu subjektiv beängstigend empfundener Atemnot führen kann und ventilatorische Alkalose zur Folge hat.

Diese Alkoholunverträglichkeit führte zum Einsatz der Substanz als Medikament.

Disulfiram selbst hat keinen Einfluß auf den Organismus. Erst in Gegenwart von Alkohol kommt es zu dem Unverträglichkeitssymptom.

Die irreversible Blockierung des Enzyms Aldehyddehydroge-

nase durch Disulfiram führt zur Anreicherung von Acetaldehyd in Blut und Gewebe. An Ratten konnte gezeigt werden, daß der Acetaldehydspiegel im Blut nach Verabreichung von Disulfiram um das 3 bis 5-fache erhöht ist (TOTTMAR und MARCHNER, 1975, 1976).

Die Symptome halten so lange an, wie Alkohol im Blut zirkuliert.

In zytogenetischen Untersuchungen wurde für Disulfiram alleine kein Hinweis auf eine chromosomenbrechende Wirkung festgestellt. Die höchste untersuchte Konzentration betrug $1 \cdot 10^{-4}$ M, die zytotoxische Konzentration betrug $8 \cdot 10^{-4}$ M (LILLY, 1975).

CYCLOPHOSPHAMID (CP)

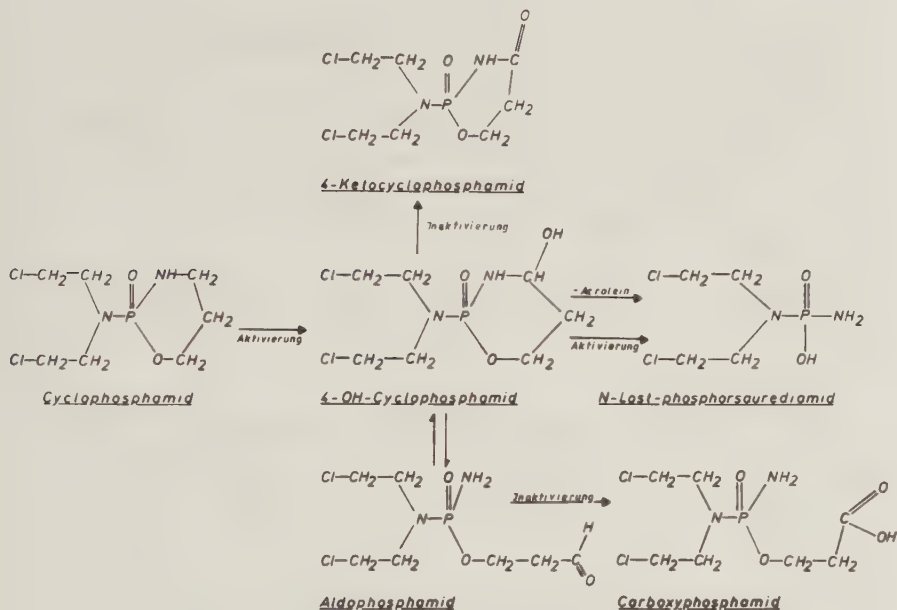
Das in dieser Arbeit als positive Referenzsubstanz verwendete Cyclophosphamid (N,N-Bis-(β -chloroäthyl)-N'-O-propylenphosphorsäureesterdiamid, Endoxan^(R), Cytosan^(R)), wurde 1958 von ARNOLD und BOUREAUX synthetisiert und wird als Chemotherapeutikum in der Krebstherapie angewendet. CP gehört in die chemische Gruppe der Stickstoff-Lost-Verbindungen und wird erst im Organismus in die eigentliche Wirkform überführt.

CP wird im Säugerorganismus vorwiegend durch die MFO der Lebermikrosomen aktiviert (BROCK und HOHORST, 1962, 1963; FOLEY et al., 1961; HAMPEL et al., 1969; DRUCKREY et al., 1963; SLADEK, 1971). Eine mengenmäßig geringere Metabolisierung findet in der Lunge und der Nebennierenrinde statt.

Bereits 15 bis 30 Minuten nach CP-Injektion sind CP-Metaboliten im Blutserum nachweisbar (FOLEY et al., 1961; BROCK und HOHORST, 1963). Danach sind Metabolite in konzentrierter Form in Urin und Galle nachweisbar (BROCK und HOHORST, 1963). Der cytotoxische Metabolit hat bei 37° C eine Halbwertszeit von etwa 15 bis 18 Minuten (BROCK und HOHORST, 1963; DRUCK-

REY et al., 1963).

Abbildung 5: Metabolismus von CYCLOPHOSPHAMID



CP wird durch die MFO der Leber zu 4-Hydroxy-cyclophosphamid aktiviert. Diese Verbindung steht im Gleichgewicht mit dem ringoffenen Aldophosphamid. Die Weiteroxidation führt zu den Metaboliten 4-Keto-cyclophosphamid und Carboxy-phosphamid, die renal ausgeschieden werden. Aus dem 4-Hydroxy-cyclophosphamid entsteht unter spontaner Abspaltung von Acrolein N-Lost-phosphorsäurediamid, die eigentliche Wirkform.

Im Urin CP-behandelter Personen konnten 4-Keto-cyclophosphamid, Carboxyphosphamid, Nornitrogenmustard, N-N'-Bis-(2-chloräthyl)-piperazin und 3-(2-chloroäthyl)oxazolidon als Metabolite des CP nachgewiesen werden (JARDINE et al., 1978;

STRUCK, et al., 1971; SULLING et al., 1978; ELLENBERGER und MOHN, 1977; COX, 1979; COLVIN et al., 1976, ARNOLD et al., 1964; COX und LEVIN, 1975).

Als einen Hauptmetaboliten des CP identifizierten FENSELAU et al., 1977 Aldophosphamid im Blutserum behandelter CP-Patienten.

CP ist ein bifunktionelles alkylierendes Agens. Die mutagene Wirkung von CP und seinen Metaboliten ist bekannt. Dabei zeigt sich, daß CP in vitro nicht mutagen ist, bei in vivo-Versuchen und nach metabolischer Aktivierung führt es zu Mutationen.

Nachfolgend sind einige Beispiele aufgeführt, in denen CP oder aktiviertes CP in Testorganismen oder Testzellen zu Mutationen führte.

Tabelle 3: Mutagenitätsbefunde mit Cyclophosphamid

Testorganismus oder Testzellen	Aberrationstyp	Literatur
Drosophila melanogaster	rezessive Letal- mutationen	BERTRAM und HÖHNE, 1959 RÖHRBORN, 1968
Vicia faba	Chromosomenbrüche	VOGEL, 1975 MICHAELIS und RIEGER, 1961
Mäuse (Lymphozyten)	Chromosomenaberrationen	ARRIGHI et al., 1962 BRITTINGER, 1966 CUMMING und WALTON, 1971
Mikroorganismen	Punktmutationen	DEGEN, 1963 MARQUARDT und SIEBERT, 1971 SIEBERT, 1973 ELLENBERGER und MOHN, 1975, 1977 McCANN et al., 1975 b BALBINDER et al. 1981 BRAUN und SCHÖNEICH, 1977
HeLa-Zellen	Chromatidenbrüche	VRBA, 1967
CHO-Zellkulturen	SCEs	STETKA und WOLFF, 1976
menschliche Lymphozyten	Chromatidenaberrationen	BAUCHINGER und SCHMID, 1969 SCHMID und BAUCHINGER, 1970

Fortsetzung Tabelle 3:

Testorganismus oder Testzellen	Aberrationstyp	Literatur
menschliche Lymphozyten	Chromatidenaberra- tionen	DOBOS et al., 1974 MADLE und OBE, 1977,1978
	SCEs	MUSILOVA, 1979 RAPOSA, 1978 DOKER, 1981 STILLER et al., 1982 MADLE und OBE, 1981

In der vorliegenden Arbeit soll der Einfluß von CBZ und Ethanol unter Verwendung verschiedener Aktivierungssysteme auf die SCE-Rate in menschlichen peripheren Lymphozyten in vitro untersucht werden.

Die Funktionsfähigkeit der verwendeten Aktivierungssysteme soll durch Cyclophosphamid, einem indirekt wirkenden Mutagen, überprüft werden.

MATERIAL UND METHODE

In der vorliegenden Arbeit wurden das Antiepileptikum CARBAMAZEPIN (CBZ), die Lösungsmittel Dimethylsulfoxid (DMSO) und ETHANOL und der Enzymhemmer Disulfiram (Antabus) mit enzymaktivierenden Systemen untersucht. Das indirekt wirkende Zytostatikum CYCLOPHOSPHAMID (N,N-Bis-Chlor-äthyl-N'-O-Propylenphosphorsäurediamid) wurde als positive Referenzsubstanz verwendet.

Die Experimente wurden mit 3- und 4-Tage-Kulturen menschlicher Leukozyten in vitro nach der von OBE et al. (1975) beschriebenen Methode durchgeführt. Das benötigte periphere Venenblut stammte von klinisch gesunden Spendern.

Eine Standard-Leukozytenkultur besteht aus:

- 4,0 ml Medium TC 199 (Seromed)
- 0,5 ml inaktiviertes fötales Kälberserum (Seromed)
- 0,12 ml Phytohämagglutinin M (Difco)
- 0,02 ml Dihydrostreptomycinsulfat-Penicillin-Gemisch
(1 ml enthält 50 mg Dihydrostreptomycinsulfat
(Heyl + Co) und 5000 I.E. Penicillin (Dauels-
berg))
- 0,4 ml peripheres, heparinisiertes Venenblut

Die Kulturen wurden in sterilen Einwegzentrifugenröhrchen (Volumen 15 ml) bei 37° C inkubiert.

Die Kulturdauer variierte in den einzelnen Versuchen (72 und 96 Stunden) und wird dort jeweils angegeben.

Zur Anreicherung von Metaphasen wurde den Kulturen 4,5 bis 6 Stunden vor Kulturrende 0,2 ml Colcemidlösung zugegeben (Endkonzentration in der Kultur 0,08 µg/ml).

Die Kulturen wurden nach dem üblichen Standardverfahren (OBE und BEEK, 1982) wie folgt aufgearbeitet:

- 1) Kulturen 10 Minuten bei 900 Umdrehungen/Minute zentrifugieren (= 200 g; Heraeus-Tischzentrifuge).
Überstand mit einer Wasserstrahlpumpe absaugen.
- 2) Zellsediment in 4 ml einer auf 37° C erwärmten 0,075 M Kaliumchlorid-Lösung resuspendieren und 12 Minuten bei 37° C inkubieren (Hypotoner Schock).
- 3) Zentrifugieren und Absaugen des Überstandes wie bei 1) beschrieben.
- 4) Fixieren des Sedimentes durch Zugabe eines frisch zubereiteten Methanol-Eisessig-Gemisches (Verhältnis 3 : 1).
10 Minuten zentrifugieren (200 g), Überstand verwerfen.
- 5) Arbeitsgang 4) zweimal wiederholen.
- 6) Zellsuspension auf entfettete, eisgekühlte Objektträger auftropfen.

BrdU-MARKIERUNG

Als genetischer Endpunkt wurden Schwesterchromatidenaustausche (SCE) untersucht. Den Kulturen wurde bei Ansatz (3-Tage-Kulturen) oder gleichzeitig bei Zugabe der Testsubstanzen (4-Tage-Kulturen) 50 µl einer 10^{-3} M Bromdesoxyuridin (BrdU)-Lösung zugegeben (Endkonzentration in der Kultur = $1 \cdot 10^{-5}$ M).

Wird BrdU, ein Basenanalogon des Thymins, über zwei Synthesephasen in die DNS eingebaut, ergibt sich in der darauffolgenden Mitose (2. Mitose nach BrdU-Zugabe) eine differentielle Anfärbbarkeit der Schwesterchromatiden. Die einfach BrdU-substituierte Chromatide (T=B) ist normal gefärbt, die Chromatide, in der BrdU in beiden DNS-Einzelsträngen das Thymidin ersetzt (B=B), ist nur schwach angefärbt.

Folgende Behandlungsarten wurden durchgeführt:

- a) Leukozytenkulturen wurden 48 Stunden nach Ansatz und 51 Stunden vor Kulturende mit den Testsubstanzen BrdU zugegeben. Nach 3 Stunden wurden die Testsubstanzen und das BrdU ausgewaschen. Die Kulturen wurden mit konditionier-

tem Medium und frischem BrdU versetzt und 48 Stunden bei 37° C inkubiert.

Das konditionierte Medium wurde gewonnen, indem parallel angesetzte unbehandelte Kulturen bei 900 Umdrehungen/Minute zentrifugiert wurden und der Überstand abgehoben wurde. Das Waschen und Sammeln des konditionierten Mediums erfolgte unter sterilen Bedingungen.

- b) Wurde Vollblut in Dialyseschläuchen (DS) dem Mutagen ausgesetzt, dann wurde den Kulturen BrdU zu Kulturbeginn zugegeben.

Die Färbung erfolgte mit leichter Modifikation nach der FPG-Methode von PERRY und WOLFF (1974):

Die etwa 5 Tage gealterten Präparate wurden

- für 15 Minuten in eine Hoechst-Farblösung (Hoechst 33258; 5 µg/ml) eingestellt,
 - mit Aqua dest. gespült,
 - mit PBS-Puffer (3,5 g Na₂HPO₄, 3,4 g KH₂PO₄ und 9 g NaCl/l Aqua dest.) besprüht,
 - 30 Minuten mit UV-Licht (260 nm) bestrahlt,
 - in einen 10 x SSC-Puffer (Saline-Sodium-Citrat; 87,66 g NaCl und 44,115 g tri-Na-citrat-2-hydrat pro l Aqua dest.) für 30 Minuten bei 60° C eingestellt,
 - mit Aqua dest. gespült und
 - in einer 5 %igen Giemsa-Farblösung für 7 Minuten gefärbt.
- Giemsa-Farblösung: 5 % Giemsa-Stammlösung (Azur-Eosin-Methylenblau, Merck)
15 % Phosphatpuffer (pH 6,88; 0,025 M)
80 % Aqua dest.

AUSWERTUNG

Zur Auswertung der Präparate wurde ein Leitz-Mikroskop mit Ölimmersions-Objektiv verwendet (Objektiv 100-fache, Okulare 10-fache Vergrößerung).

EXPERIMENTALSERIE I

RATTENLEBERPERFUSION

Die Rattenleberperfusion ist eine vor allem in der pharmakologischen Forschung seit Jahren bewährte Methode zur Untersuchung von Stoffwechselvorgängen in der Leber.

In jüngster Zeit wurde die Rattenleberperfusion in der Mutationsforschung zum Nachweis indirekter Mutagene verwendet (MADLE et al., 1978; MADLE und OBE, 1981; BEIJE et al., 1979; FORTI und TRIEFF, 1980; ESSIGMANN et al., 1980; ABE et al., 1981).

Der Aufbau der Perfusionsapparatur und die Operationstechnik entsprachen den in der Literatur mehrfach beschriebenen Methoden (MILLER et al., 1951; SCHIMASSEK, 1963; EXTON, 1975; MORTIMORE, 1961; HEMS et al, 1966; WESTPHAL, 1977; MADLE, 1979).

Die Perfusionsapparatur (Abb. 6, Seite 42) besteht aus:

- 1) einer GLASSÄULE, die in THERMOGEHÄUSE und OXIGENATOR unterteilt ist. Die Innenwand des Oxigenators ist zur Oberflächenvergrößerung mit zahlreichen Zapfen versehen. Der Oxigenator besitzt ein Auffangbecken für das Perfusionsmedium (Reservoir) und fünf Verbindungen nach außen:
 - a) zur O₂-Anreicherung
 - b) Überlauf
 - c) Verbindung zur Vena portae
 - d) Anschluß zur Rollenpumpe
 - e) blind endende Verbindung
- 2) einer Rollenpumpe (Firma Desaga, Typ 131900)
- 3) einem Mischgefäß
- 4) einer Sauerstoffzuleitung durch eine Waschflasche
- 5) einem Magnetührer mit Thermostat

Die Perfusionsflüssigkeit wurde aus dem Mischgefäß mit Hilfe der Rollenpumpe zum oberen Ende des Oxigenators gepumpt und floß an der Innenseite des Oxigenators in das Reservoir. Zur

Sauerstoffanreicherung wurde die Perfusionsflüssigkeit mit O_2 begast und vor dem Eintritt in den Oxigenator durch eine wassergefüllte Waschflasche geleitet. Der Oxigenator wurde temperiert, indem auf $37^\circ C$ erwärmtes Wasser das Thermogehäuse durchströmte. Aus dem Reservoir wurde das Perfusionsmedium durch die Vena portae (Pfortader) in die Leber geleitet. Aus der Vena cava caudalis (obere Hohlvene) trat die Flüssigkeit wieder aus und wurde in das Mischgefäß zurückgeleitet. Damit der hydrostatische Druck beim Eintritt in die Leber konstant auf 180 -200 mm gehalten wurde, konnte überschüssige Flüssigkeit aus dem Reservoir durch den Überlauf in das Mischgefäß zurückfließen.

OPERATIONSTECHNIK

Sechs bis acht Wochen alte männliche LE-(Long-Evans) Ratten oder Wistar-Ratten (Gewicht etwa 300 - 400g) wurden mit Nembutal (Abbot; 6 %ige Lösung) intraperitoneal narkotisiert. Eine Koagulation im Blutgefäßsystem während der Operation wurde durch Injektion von 0,1 ml Liquemin (= 100 E. Heparin, Hoffmann-La-Roche) in die Vena saphena magna vermieden.

Die Bauchhöhle wurde geöffnet und je eine lose Ligatur um die Vena cava caudalis und die Aorta hepatica gelegt. Die V. portae wurde mit drei Ligaturen versehen und anschließend mit einer Braunüle (Größe 1, Fa. Braun) kanüliert. Die Nadel wurde aus der Braunüle entfernt und die Braunüle mit einem sterilen Stopfen verschlossen (Fa. Braun). Die Braunüle wurde durch Zuziehen von zwei Ligaturen fixiert. Das Zuziehen der dritten Ligatur verhinderte den Blutfluß vom Magen-Darm-Trakt und der Milz zur V. portae.

Danach wurde der Thorax geöffnet, das Brustbein zurückgelegt und Nervus vagus und N. phrenicus zwecks Unterbrechung der Reizleitung zum Diaphragma durchtrennt. Eine lose Ligatur wurde um die Vena cava caudalis zwischen Diaphragma und Herz gelegt. Die Kanülierung der Vena cava caudalis erfolgte mit einer Braunüle (Größe 1; Fa. Braun) vom rechten Herzvorhof

aus. Anschließend wurden die abdominale Vena caudalis, die Aorta hepatica und die Vena portae distal abgebunden.

An die obere Braunüle wurde ein Polyäthylenschlauch ($\emptyset = 2,1$ mm) angeschlossen und zum Mischgefäß geleitet (Abfluß).

Die so präparierte Ratte wurde an das Perfusionssystem angeschlossen, wobei besonders darauf geachtet wurde, daß beim Anschluß des zulaufenden Perfusionsmediums an die Braunüle der Vena portae keine Luftbläschen in die Leber gelangten.

Die ersten 10 ml des abfließenden Perfusionsmediums enthielten das in der Leber verbliebene Rattenblut und wurden verworfen. Danach wurde das Perfusat in das Mischgefäß geleitet.

Als Perfusionsmedium wurde Tyrode-Lösung verwendet, die mit 30 g/l β -Hydroxiäthylstärke (HXS; Fresenius) angereichert wurde.

Die Tyrodelösung ist eine Salzlösung, deren Elektrolytenkonzentrationen den Werten des Rattenplasmas entsprechen.

Die Tyrodelösung besteht aus:

NaCl	137	mM
KCl	5,9	mM
$\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	1,8	mM
$\text{MgCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$	0,49	mM
NaHCO_3	11,9	mM
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	1,22	mM
Na-L-Laktat	1,33	mM
Na-Pyruvat	0,09	mM
D-Glucose $\cdot \text{H}_2\text{O}$	5,45	mM

Vor Beginn der Perfusion wurden etwa 150 bis 200 ml auf 37°C vorgewärmtes Perfusionsmedium in das Mischgefäß gegeben und mit den Testsubstanzen angereichert. Zur Gleichgewichtseinstellung wurde die Perfusionsflüssigkeit vor dem Anschluß an die Leber für einige Minuten durch das Zirkulationssystem gepumpt.

Die Perfusionen wurden nach zwei Systemen durchgeführt:

1. OFFENES PERFUSIONSSYSTEM

Etwa 10 ml Perfusat wurden nach einmaligem Leberdurchfluß gesammelt, steril filtriert und in unterschiedlichen Konzentrationen auf stimulierte Lymphozytenkulturen gegeben. Nach etwa 3 Stunden wurde das Perfusat mit den Testsubstanzen ausgewaschen (3 mal mit erwärmten Medium TC 199). Anschließend wurde den Kulturen konditioniertes Medium zugegeben und diese 48 Stunden weiterinkubiert.

2. REZIRKULIERENDES PERFUSIONSSYSTEM

Das Perfusat wurde nach der Leberdurchströmung in das Mischgefäß geleitet und mehrmals (bis zu 100 Minuten) durch die Leber gepumpt.

Hierbei können sich die durch die Leber gebildeten Metabolite anreichern. Etwa 10 Minuten nach Perfusionsbeginn wurden mit Vollblut versehene Dialyseschläuche in das Mischgefäß mit dem Perfusat gegeben und unterschiedlich lange (bis zu 2 Stunden) den Testsubstanzen ausgesetzt.

Es wurden insgesamt 18 Perfusionen durchgeführt. Eine Übersicht der getesteten Substanzen und der Bedingungen der jeweiligen Perfusion gibt Tabelle 4, Seite 46.

Tabelle 4: Parameter der durchgeführten Leberperfusionen

Perfu- sions- Nr.	Testsubstanz + Konzentration im Perfusat	Ratte g	Nembu- tal ml	Perfu- sions- dauer Minuten	Perfu- sions- fluß ml/Min.	Blut- spen- der Alter
P- 1	Tyrode-Lö- sung + HAS	LE-R. 350	1,5	30	10	MK Q 30 ⁺
P- 2	DMSO 3,5 %	LE-R. 300	0,8	30	10	MK Q 31 ⁺
P- 3	Ethanol 3,5 %	LE-R. 300	0,8	30	10	MK Q 30 ⁺
P- 4	Ethanol 3,5 %	LE-R. 350	0,8	30	12	MK Q 31 ⁺
P- 5	Ethanol 3,5 %	LE-R. 300	0,6	30	10	SM O ⁺ 28
P- 6	Cyclophos- phamid 3,5·10 ⁻³ M	Wistar- R. 350	0,7	30	12	MK Q 31 ⁺
P- 7	Cyclophos- phamid 1·10 ⁻³ M	Wistar- R. 350	1,1	100	10	MK Q 32 ⁺
P- 8	Cyclophos- phamid verschiedene Konzentratio- nen	Wistar- R. 350	0,7	45	12	MK Q 32 ⁺
P- 9	Carbamazepin 350 µg/ml in DMSO 3,5 %	Wistar- R. 300	0,7	30	12	MK Q 31 ⁺
P-10	Carbamazepin 350 µg/ml in DMSO 3,5 %	LE-R. 300	0,5	45	10	MK Q 31 ⁺
P-11	Carbamazepin 350 µg/ml in DMSO 3,5 %	Wistar- R. 300	0,7	75	10	MK Q 32 ⁺
P-12	Carbamazepin 350 µg/ml in Ethanol 3,5%	Wistar- R. 350	0,5	30	10	SM O ⁺ 28
P-13	Carbamazepin 350 µg/ml in Ethanol 3,5%	LE-R. 350	0,9	30	10	MK Q 31 ⁺
P-14	Carbamazepin 350 µg/ml in Ethanol 3,5%	LE-R. 350	0,5	45	10	MK Q 31 ⁺

Fortsetzung Tabelle 4:

Perfu- sions- Nr.	Testsubstanz + Konzentration im Perfusat	Ratte g	Nembu- tal ml	Perfu- sions- dauer Minuten	Perfu- sions- fluß ml/Min.	Blut- spen- der Alter
P-15	Carbamazepin in Ethanol verschiedene Konzentrationen	Wistar- R. 350	0,7	30	15	MK Q 32 ⁺
P-16	Disulfiram 1·10 ⁻⁵ M in Ethanol 3,5 %	LE-R. 300	0,6	30	8	SM ♂ 28
P-17	Disulfiram 1·10 ⁻⁵ M in Ethanol 3,5 %	LE-R. 350	0,7	30	10	MK Q 30 ⁺
P-18	Disulfiram 1·10 ⁻⁵ M in Ethanol 3,5 %	LE-R. 350	0,7	30	10	MK Q 30 ⁺

BEHANDLUNG

- A) Etwa 10 ml des Perfusats wurden nach einer einmaligen Leberdurchströmung gesammelt und steril filtriert (Porengröße 0,2 µm; Schleicher + Schüll). Die Verdünnungen erfolgten mit Medium TC 199 so, daß bei Zugabe von 2 ml zu einer 5 ml Kultur die gewünschte Konzentration erreicht wurde.

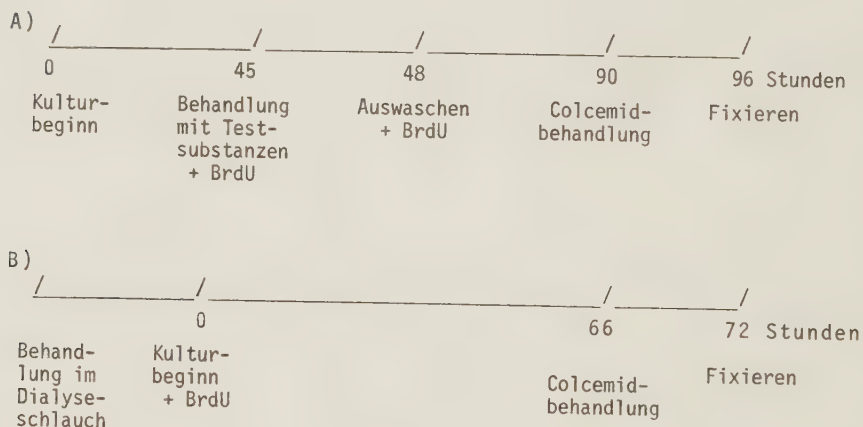
Der Kontrollkultur wurden 2 ml Medium TC 199 zugegeben. Die Kulturen wurden mit 50 µl einer 10⁻³ M BrdU-Lösung versetzt.

Nach 3 Stunden Behandlungsdauer wurden die Substanzen ausgewaschen. Zum Auswaschen wurden die Kulturen 10 Minuten bei 37°C zentrifugiert (900 Umdrehungen/Minute), der Überstand vorsichtig abgehoben und das Zellsediment mit 5 ml erwärmtem Medium TC 199 versetzt. Die Kulturen wurden umgeschüttelt, und der Vorgang wurde nochmals wiederholt. Danach wurde das Zellsediment mit 4,6 ml temperiertem, mit BrdU angereichertem konditioniertem Medium versetzt und die Kulturen für 48 Stunden inkubiert.

- B) Je 1,5 ml Vollblut wurden in sterile Dialyseschläuche (Serva,

Typ 8/32; Durchmesser 1 cm, Porengröße 15-20 Å, Ausschlußgrenze 10000 bis 20000 Dalton) gegeben und unterschiedlich lange in dem rezirkulierenden Perfusat belassen. Nach der jeweiligen Inkubationszeit wurde der Dialyseschlauch aus dem Perfusat entfernt. Das Blut wurde mit einer sterilen Einwegspritze (Luer; Fa. Braun) entnommen und je Behandlungszeit jeweils 2 Parallelkulturen angesetzt. Nach 72 Stunden Inkubationszeit (einschließlich 6 Stunden Colcemid-Behandlung) erfolgte die Aufarbeitung der Kulturen.

BEHANDLUNGSSCHEMA:



EXPERIMENTALSERIE II

BEHANDLUNG VON LYMPHOZYTENKULTUREN MIT S 9-MIX IN VITRO

Ein weiteres Testsystem zum Nachweis indirekt wirkender Mutagene ist die Behandlung von Lymphozyten mit S 9-Mix.

Die Experimente wurden nach der von MADLE und OBE (1977) und MADLE (1981) entwickelten Methode durchgeführt.

S 9-Mix wird durch Zentrifugation homogenisierter Leber bei 9000 g gewonnen. Der Überstand enthält die zur Metabolisierung von Testsubstanzen wichtigen Enzyme.

In den ersten beiden durchgeführten Experimenten handelte es sich um die gleiche S 9-Fraktion (Bionetics) mit einem Proteingehalt von 24,5 mg/ml und einer Benzo-(a)-pyrene-hydroxylase-Aktivität von 8,8 nMol Hydroxybenzpyrene/20 Minuten/mg Protein).

Von der S 9-Fraktion wurde eine 12,1 %ige S 9-Lösung hergestellt. Die Verdünnung erfolgte mit Medium TC 199. Der S 9-Lösung wurden die Co-Faktoren NADP und Glucose-6-Phosphat (G-6-P) zugegeben. Die Konzentration betrug für NADP 1 mM und für G-6-P 2mM in der Kultur.

BEHANDLUNG

A) 45 Stunden nach Kulturbeginn wurden die Testsubstanzen zu den Kulturen gegeben. Je 1 ml S 9-Lösung mit Co-Faktoren wurde in sterile Dialyseschläuche gegeben. Jede Kultur wurde mit einem Dialyseschlauch versehen. Den Kulturen wurden die Testsubstanzen und 50 µl BrdU-Lösung (10^{-3} M) zugegeben. Nach 3 Stunden wurden die Dialyseschläuche aus den Kulturen entfernt. 72 Stunden nach Kulturansatz wurden die Testsubstanzen aus den Kulturen ausgewaschen und mit frischem Vollmedium (+ BrdU) für weitere 24 Stunden inkubiert.

B) Parallel angesetzten Kulturen wurde nach 45 stündiger Inkubationszeit 1 ml 12,1 %ige S 9-Lösung (2 % in der Kultur) direkt zugegeben. Nach 60 Minuten Behandlungszeit wurde die S 9-Lösung mit den Testsubstanzen entfernt (ausgewaschen).

Der S 9-Mix wirkt auf die Zellen stark toxisch. Eine solche Wirkung konnte aber durch Verdünnung und kurze Behandlungszeit vermieden werden.

BEHANDLUNGSSCHEMA

Für die Experimentalserie mit S 9-Mix wurden folgende Kulturen angesetzt:

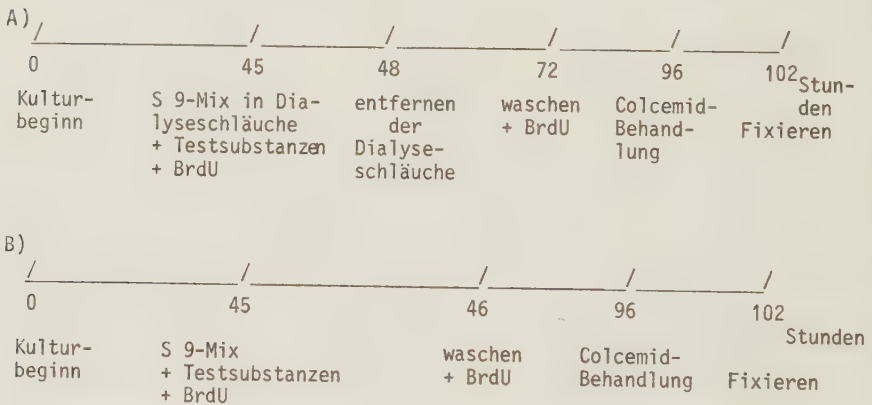
BrdU-Kontrolle

DMSO-Kontrolle (DMSO-Konzentration in der Kultur = 1 %)

Positiv-Kontrolle mit Cyclophosphamid ($5 \cdot 10^{-6}$ M)

Carbamazepin (12,5; 25,0; 50,0 + 100,0 $\mu\text{g/ml}$)

Carbamazepin wurde in DMSO gelöst. Allen Kulturen wurde mit der Behandlung BrdU zugegeben (Konzentration in der Kultur 10^{-5} M). Die Kulturzeit betrug 102 Stunden einschließlich 6 Stunden Colcemid-Behandlung.



Es wurden zwei unabhängige Versuche zu den gleichen Versuchsbedingungen durchgeführt. Pro Kultur wurden bis zu 40 Mitosen auf SCEs ausgewertet.

Versuch 3: PULSBEHANDLUNG MENSCHLICHER LYMPHOZYTEN MIT S 9-MIX, ETHANOL ODER ETHANOL UND DISULFIRAM

Die S 9-Behandlung wurde nach der von PERRY et al. (1983) beschriebenen Methode durchgeführt.

Die verwendete S 9-Fraktion (Bionetics, Fresenius) hatte einen Proteingehalt von 30 mg/ml und eine Benzo-(a)-pyrene-hydroxylase-Aktivität von 6,5 nM Hydroxybenzpyren/20 Minuten/mg Protein.

Das Reaktionsgemisch wurde kurz vor der Verwendung hergestellt und setzt sich für eine Kultur wie folgt zusammen:

4,4	ml	McCOYs 5 A-Medium
50	µl	Coenzym-Lösung (1,58 mg NADP + 0,76 mg G-6-P, gelöst in McCoys 5 A-Medium)
50	µl	S 9-Fraktion (= 1 % S 9-Fraktion in der Kultur)

Die S 9-Fraktion wurde unmittelbar vor der Verwendung aufgetaut. Die Kulturen wurden nach der Standardkulturvorschrift (OBE et al 1975) mit McCOYs-Medium angesetzt. Nur während der einstündigen Behandlungszeit waren die Kulturen BrdU-frei, sonst enthielten sie $1 \cdot 10^{-5}$ M BrdU.

BEHANDLUNG:

47,5 Stunden nach Kulturbeginn wurde das Kulturmedium entfernt, die Zellen einmal mit Hank's-Medium gewaschen und mit dem Reaktionsgemisch und den Testsubstanzen (siehe Behandlungsprotokoll) zur 48. Kulturstunde eine Stunde lang behandelt. Danach wurden die Kulturen zweimal mit erwärmtem Hank's-Medium gewaschen und mit frischem Vollmedium (+ BrdU) für weitere 24 Stunden inkubiert.

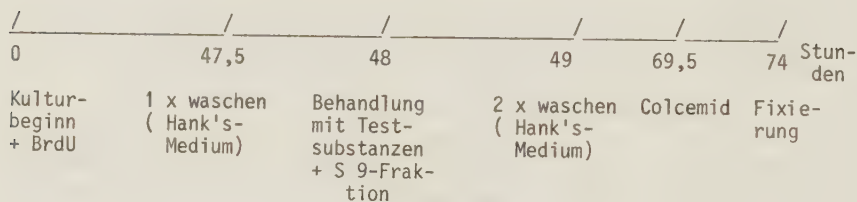
BEHANDLUNGSPROTOKOLL

Folgende Kulturen wurden angesetzt:

BrdU-Kontrolle	mit und ohne S 9-Fraktion
Cyclophosphamid-Kontrollen ($1 \cdot 10^{-5}$; $3,3 \cdot 10^{-5}$; $1 \cdot 10^{-4}$ M)	mit und ohne S 9-Fraktion
Ethanol (0,5; 1,0; 1,5 Vol.%)	mit S 9-Fraktion
(1,5 Vol.%)	ohne S 9-Fraktion
Ethanol (0,5; 1,0; 1,5 Vol.%) + Disulfiram	mit S 9-Fraktion
Ethanol (1,5 Vol.%) + Disulfiram (10^{-5} M)	ohne S 9-Fraktion

Die Kulturzeit betrug 74 Stunden einschließlich 4,5 Stunden Colcemid-Behandlung.

BEHANDLUNGSSCHEMA



Chromosomenpräparate wurden nach dem auf Seite 38 beschriebenen Standardverfahren hergestellt. Die etwa 2 Tage gealterten Präparate wurden nach der auf Seite 40 beschriebenen FPG-Färbemethode mit folgender Modifikation gefärbt:

Die Objektträger wurden mit PBS-Puffer beschichtet, mit einem Deckglas versehen und 10 Minuten lang dem Licht einer Schwarzlichtlampe (Philips 20 W F 20 T12BLB) ausgesetzt. Danach wurden die Präparate mit Aqua dest. gespült und in einer 5 %igen Giemsa-Farblösung 7 Minuten lang gefärbt.

Für jeden Untersuchungspunkt wurden jeweils 2 Parallelkulturen angelegt, und pro Kultur wurden 25 Metaphasen nach SCEs ausgewertet (= 50 Metaphasen pro Punkt).

Das Blut stammte von zwei klinisch gesunden männlichen Probanden (A = 32 Jahre; B = 33 Jahre)

EXPERIMENTALSERIE III:

METABOLISCHE AKTIVIERUNG MIT HOMOGENAT AUS SCHWEINELEBER

Mit den folgenden Experimenten sollte analysiert werden, ob Homogenisat aus Schweineleber zur in vitro-Metabolisierung verwendet werden kann.

Eine Schweineleber wiegt mehr als 1 kg und liefert nach Homogenisieren und portioniertem Einfrieren von jeweils 100 g ge-

nügend Material für mehrere Untersuchungen.

Bei diesen Versuchen sollen, ähnlich wie bei der Perfusion (Rezirkulierendes System), die Testsubstanzen im Homogenat metabolisiert und Vollblut mittels Dialyseschläuchen unterschiedlich lange diesem Aktivierungssystem ausgesetzt werden.

Die verwendete schlachtfrische Schweineleber (1,2 kg schwer) erhielten wir freundlicherweise von Herrn Dr. Brandes vom Schlachthof Berlin. Zwischen Töten und Aufbrechen des Tieres verging -bedingt durch die innerbetriebliche Organisation im Schlachthof- eine Zeitspanne von etwa 20 Minuten. Die Leber wurde zwischen Eis gelagert und sofort zum Institut transportiert (etwa 45 Minuten). Danach wurde sie mit einem Homogenisator (Ultra turrax; Ika-Werk; 2000 Umdrehungen/Minute) in der Kälte homogenisiert, portionsweise (etwa 100 g) in Polyäthylengefäße abgefüllt und bei -80°C aufbewahrt.

12 Stunden vor jedem Versuch wurde ein Gefäß mit Homogenat im Kühlschrank bei etwa 4°C aufgetaut. Danach wurde das Leberhomogenat im Verhältnis 1:1 mit einer 37°C warmen Pufferlösung vermischt. Das fertige Aktivierungsgemisch enthielt:

Phosphatpuffer	18,6 mM	(pH 7,2)
KCl	20,0 mM	
MgCl ₂	16,0 mM	

Die Konzentration der Coenzyme im Aktivierungsgemisch betrug für NADP 1 mM und für Glukose-6-Phosphat 2 mM.

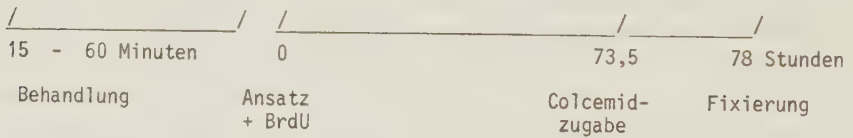
Je 1,2 ml Vollblut wurden in sterilen Dialyseschläuchen (DS) in das Aktivierungsgemisch gegeben und dort unterschiedlich lange bei 37°C inkubiert.

Das Aktivierungsgemisch wurde während der Behandlung von Zeit zu Zeit umgerührt. Nach der jeweils gewünschten Inkubationszeit wurde ein Dialyseschlauch aus dem Homogenat entnommen und mit warmem Medium abgespült. Das Blut wurde dem Dialyseschlauch mit einer sterilen Einwegspritze entnommen und je-

weils zwei Kulturen angesetzt.

Die Kulturzeit betrug 78 Stunden einschließlich 4,5 Stunden Colcemid-Behandlung. Danach erfolgte die Aufarbeitung der Kulturen und die Färbung der Präparate nach der auf Seite 38 und Seite 40 beschriebenen Methode.

BEHANDLUNGSSCHEMA:



TESTSUBSTANZEN UND TESTZEITEN:

Experiment 1: CARBAMAZEPIN (CBZ; 100 µg/ml) gelöst in ETHANOL (0,75 Vol.%)

BrdU-Kontrolle	ohne Leber	60 Minuten
CBZ + Ethanol-Kontrolle	ohne Leber	60 Minuten
BrdU-Kontrolle	mit Leber	60 Minuten
Cyclophosphamid-Kontrolle (10^{-3} M)	mit Leber	30, 60 Minuten
CBZ + Ethanol	mit Leber	15, 30, 45, 60 Minuten

Experiment 2: ETHANOL (0,5 Vol.%)

BrdU-Kontrolle	ohne Leber	60 Minuten
Ethanol-Kontrolle	ohne Leber	60 Minuten
BrdU-Kontrolle	mit Leber	60 Minuten
Cyclophosphamid-Kontrolle (10^{-3} M)	mit Leber	30, 60 Minuten
Ethanol	mit Leber	15, 30, 45, 60 Minuten

Experiment 3: ETHANOL (0,5 Vol.%) und DISULFIRAM (10^{-5} M)

BrdU-Kontrolle	ohne Leber	60 Minuten
Ethanol + Disulfiram-Kontrolle	ohne Leber	60 Minuten
Cyclophosphamid-Kontrolle (10^{-3} M)	ohne Leber	60 Minuten
BrdU-Kontrolle	mit Leber	60 Minuten

Fortsetzung Experiment 3:

Cyclophosphamid-Kontrolle (10^{-3} M)	mit Leber	30, 60 Minuten
Ethanol + Disulfiram	mit Leber	15, 30, 45, 60 Minuten

Für diese Versuche wurde Blut von zwei klinisch gesunden männlichen Probanden verwendet (I, 35 Jahre, MR; II, 33 Jahre, PK).

Es wurden jeweils 2 Parallelkulturen angesetzt und - soweit möglich - für jeden Untersuchungspunkt 50 Metaphasen (25 pro Parallelkultur) ausgewertet. Wenn eine Parallelkultur keine 25 analysierbaren zweiten Mitosen enthielt, wurden entsprechend mehr Mitosen aus der anderen Parallelkultur ausgewertet.

ERGEBNISSE

Die Versuche wurden mit menschlichen Leukozyten *in vitro* durchgeführt. Das Blut stammte von klinisch gesunden Spendern. In der Auswertung wurden ausschließlich SCE-Raten bestimmt; strukturelle Chromosomenaberrationen wurden nicht berücksichtigt.

Die Ergebnisse der in dieser Arbeit durchgeführten Experimente werden in folgender Reihenfolge dargestellt:

EXPERIMENTALSERIE I: RATTENLEBERPERFUSION
A. Offenes Perfusionssystem
B. Rezirkulierendes Perfusionssystem

EXPERIMENTALSERIE II: PULSBEHANDLUNG MIT S 9-MIX
A. in Dialyseschläuchen
B. direkte Applikation

EXPERIMENTALSERIE III: SCHWEINELEBERHOMOGENAT

Experimentalserie I: Rattenleberperfusion

Bei allen Perfusionsexperimenten wurden sowohl die behandelten als auch die Kontrollkulturen parallel angesetzt. Die SCE-Raten aus Parallelkulturen wurden gemittelt.

Experimentalserie I. A: Rattenleberperfusion - Offenes System

In dieser Experimentalserie sollte untersucht werden, ob die nach einer einmaligen Leberdurchströmung gebildeten Metabolite der jeweiligen Testsubstanz -in Abhängigkeit von der Konzentration- einen Einfluß auf die SCE-Rate in menschlichen Lymphozyten haben.

Experiment 1: Pulsbehandlung mit perfundiertem DMSO
(Konzentration im Perfusat = 3,5 %; Tabelle 5)

Es wurde ein Versuch mit vier Parallelkulturen, die mit DMSO behandelt wurden und zwei unbehandelten Kontrollkulturen durchgeführt.

Die DMSO-Konzentration in der Kultur betrug 1 %.

Die Behandlung von Lymphozytenkulturen mit perfundiertem DMSO zeigte im Vergleich zu den Kontrollkulturen keine Erhöhung der SCE-Rate.

Die SCE-Rate der Kontrollkulturen betrug 6,36 SCE/Metaphase und für die DMSO-Kulturen 6,84 SCE/Metaphase.

Experiment 2: Pulsbehandlung mit perfundiertem Carbamazepin (CBZ), gelöst in DMSO (Tabelle 6)

350 µg/ml CBZ wurden perfundiert. Die DMSO-Konzentration im Perfusat betrug 3,5 %. In diesem Experiment wurden 12,5; 25; 50 und 100 µg/ml metabolisiertes CBZ (berechnet nach der Ausgangskonzentration im Perfusat) getestet.

Drei unabhängige Experimente wurden durchgeführt (P-9 bis P-11).

Die SCE-Raten der unbehandelten Kontrollen (O-KO) betragen 7,42 und 7,68 SCE/Metaphase. Die SCE-Raten der behandelten Kulturen liegen zwischen 5,24 und 7,68 SCE/Metaphase. Es sind keine dosisabhängigen Effekte festzustellen. Im Vergleich zu den O-KO ist keine SCE-Erhöhung nachweisbar.

Experiment 3: Pulsbehandlung mit perfundiertem Carbamazepin (CBZ) gelöst in Ethanol (Tabelle 7)

350 µg/ml CBZ wurden perfundiert. Die Ethanolkonzentration im Perfusat betrug 3,5 %. In diesem Experiment wurden 12,5; 25; 50 und 100 µg/ml metabolisiertes CBZ (berechnet nach der Ausgangskonzentration im Perfusat) getestet.

Der Unterschied zu Experiment 2 liegt in der Verwendung des Lösungsmittels Ethanol anstelle von DMSO.

Es wurden drei unabhängige Versuche durchgeführt (P-12 bis P-14)

Die SCE-Raten der O-KO liegen zwischen 5,25 und 6,88 SCE/Metaphase. Die SCE-Raten der behandelten Kulturen liegen zwischen 4,85 und 7,07 SCE/Metaphase. Es sind keine dosisabhängigen Effekte im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen festzu-

stellen.

Experiment 4: Pulsbehandlung mit perfundiertem Cyclophosphamid (CP), gelöst in Tyrode-Lösung + HXS
(Tabelle 8)

Mit der metabolisch positiv wirkenden Substanz CP wurden zwei Versuche durchgeführt. Im ersten Versuch (P-6) betrug die perfundierte CP-Konzentration $3,5 \cdot 10^{-3}$ M. In diesem Experiment wurden vier Konzentrationen von perfundiertem CP in den Kulturen getestet ($0,125 \cdot 10^{-3}$ M bis $1 \cdot 10^{-3}$ M).

Die SCE-Raten der O-KO betrugen 6,42 und 7,40 SCE/Metaphase. Die SCE-Raten der CP-behandelten Kulturen stiegen von 28,06 SCE/Metaphase bei Konzentration $0,125 \cdot 10^{-3}$ M auf 73,88 SCE/Metaphase bei $0,5 \cdot 10^{-3}$ M an.

$1 \cdot 10^{-3}$ M CP hemmte die mitotische Aktivität deutlich. Es konnten vereinzelt Mitosen ausgewertet werden ($\emptyset = 95,5$ SCE/Metaphase), die aufgrund der geringen Anzahl jedoch unberücksichtigt bleiben.

Im zweiten Versuch (P-7) wurde die perfundierte CP-Konzentration auf $1 \cdot 10^{-3}$ M reduziert.

In diesem Experiment wurden vier Konzentrationen von perfundiertem CP in den Kulturen getestet ($0,035 \cdot 10^{-3}$ M bis $0,286 \cdot 10^{-3}$ M).

Die SCE-Rate der O-KO betrug 8,3 SCE/Metaphase. Die CP-Konzentration $0,035 \cdot 10^{-3}$ M zeigte im Vergleich zu der O-KO mit 8,7 SCE/Metaphase keinen Effekt. Die beiden nächsthöheren Konzentration $0,071$ und $0,143 \cdot 10^{-3}$ M liegen mit 10,86 und 10,42 SCE/Metaphase nur unwesentlich über Kontrollniveau. Lediglich bei der CP-Konzentration von $0,286 \cdot 10^{-3}$ M ist die SCE-Rate mit 22,52 SCE/Metaphase im Vergleich zur O-KO verdreifacht.

Die beiden folgenden Versuche stellen eine Variante des offenen Perfusionssystems dar. In den vorangegangenen Versuchen wurde jeweils eine definierte Konzentration der jeweiligen Substanz perfundiert und die unterschiedlichen Konzentrationen durch

Verdünnung des Perfusats mit Medium TC 199 erreicht.

In den beiden folgenden Versuchen wurden nacheinander unterschiedliche Konzentrationen perfundiert und jeweils eine definierte Menge (hier 2 ml Perfusat/ 5 ml-Kultur) zu den Kulturen gegeben.

Dieses System hat den Vorteil, daß man mit derselben Rattenleber eine perfundierte O-KO, eine Lösungsmittel-Kontrolle und das Mutagen testen kann.

Als Nachteil muß einkalkuliert werden, daß eine gewisse Ungenauigkeit durch Verdünnung des im Reservoir befindlichen Restperfusats unvermeidlich ist.

Experiment 5: Pulsbehandlung mit perfundiertem Carbamazepin (CBZ) in verschiedenen Konzentrationen
Lösungsmittel = Ethanol (Tabelle 9)

Vier CBZ-Konzentrationen wurden getestet (12,5 - 100 µg/ml). Die SCE-Rate der O-KO lag bei 7,42 SCE/Metaphase. Die SCE-Rate der behandelten Kulturen lag zwischen 6,24 und 7,74 SCE/Metaphase. Eine Erhöhung der SCE-Rate zu der O-KO und eine Dosisabhängigkeit sind nicht festzustellen.

Experiment 6: Pulsbehandlung mit perfundiertem Cyclophosphamid (CP) in verschiedenen Konzentrationen
(Tabelle 10)

In diesem Experiment wurden vier Konzentrationen CP getestet ($0,125 \cdot 10^{-3}$ M bis $1 \cdot 10^{-3}$ M). Neben einer O-KO wurde eine unperfundierte Substanzkontrolle (CP-KO) in einer Konzentration von $0,5 \cdot 10^{-3}$ M getestet.

Die SCE-Rate der O-KO liegt bei 7,85 SCE/Metaphase, die der CP-KO bei 7,20 SCE/Metaphase. Die mit perfundiertem CP behandelten Kulturen wiesen eine SCE-Rate zwischen 17,5 SCE/Metaphase ($0,125 \cdot 10^{-3}$ M) und 39,26 SCE/Metaphase ($1 \cdot 10^{-3}$ M) auf.

Experimentalserie I. B: Rattenleberperfusion - Rezirkulierendes System (RPS)

Bei dieser Experimentalserie wird, im Gegensatz zum offenen Perfusionssystem, das Perfusat im Mischgefäß gesammelt und immer wieder durch die Leber geleitet. Die Metabolite können sich anreichern. Vollblut wurde mittels Dialyseschläuchen (DS) in das die Metabolite enthaltende Perfusat gegeben. In dieser Experimentalserie sollte untersucht werden, ob mit der Länge der Zeit, die die Lymphozyten den Metaboliten ausgesetzt sind, die SCE-Rate beeinflusst wird (Zeit-Effekt-Beziehung).

Bei den Kontrollkulturen wurden die DS in Medium TC 199 belassen.

Experiment 1: Perfusionskontrolle

Tyrolerlösung + HXS wurden perfundiert
(Tabelle 11)

Die DS wurden zwischen 7 und 120 Minuten im Perfusat belassen. Es wurde ein Versuch durchgeführt.

Die SCE-Raten liegen zwischen 6,02 und 7,33 SCE/Metaphase. Eine Zeit-Effekt-Beziehung ist nicht nachweisbar.

Experiment 2: Perfundiertes DMSO (Tabelle 12)

Die DMSO-Konzentration im Perfusat betrug 3,5 %.

Die DS wurden zwischen 7 und 240 Minuten im Perfusat belassen. Ein Versuch wurde durchgeführt.

Die SCE-Raten der 0-KO liegen für 120 Minuten bei 6,15 SCE/Metaphase und für 240 Minuten bei 8,42 SCE/Metaphase.

Die SCE-Raten der behandelten Kulturen lagen zwischen 6,88 und 8,38 SCE/Metaphase. Eine Zeit-Effekt-Beziehung ist nicht nachweisbar.

Experiment 3: Perfundiertes Ethanol (Tabelle 13)

Die Ethanol-Konzentration im Perfusat betrug 3,5 %.

Die DS wurden zwischen 7 und 120 Minuten im Perfusat belassen.

Es wurden drei unabhängige Versuche durchgeführt.

Bei den Versuchen P-3 (15 Minuten Behandlungszeit) und P-4 (Kontrolle) waren die Kulturen mit Hefen kontaminiert und nicht auswertbar.

Die SCE-Raten für die O-KO liegen zwischen 4,93 und 7,36 SCE/Metaphase. Die SCE-Raten der behandelten Kulturen liegen zwischen 4,94 und 9,20 SCE/Metaphase.

Für den Versuch P-4 ist keine Zeit-Effekt-Beziehung nachweisbar. In Versuch P-3 steigt die SCE-Rate von 7,24 (O-KO) auf 9,20 SCE/Metaphase bei 120 Minuten Behandlung an. Mit Hilfe des U-Tests nach WILCOXON und MANN und WHITNEY (SIEGEL, 1956; SACHS, 1968) sollen die Ergebnisse von Versuch P-3 statistisch überprüft werden.

Experiment 4: Perfundiertes Cyclophosphamid (CP) (Tabelle 14)

Die CP-Konzentration im Perfusat betrug $1 \cdot 10^{-3}$ M.

Die DS wurden zwischen 7 und 120 Minuten im Perfusat belassen. Es wurden zwei unabhängige Versuche durchgeführt.

In Versuch P-7 konnten bei einer Behandlungszeit von 120 Minuten keine zweiten Mitosen nachgewiesen werden.

In Versuch P-8 konnten bei 60- und 120 Minuten Behandlungszeit nur vereinzelt zweite Mitosen ausgewertet werden, die in der Bewertung nicht berücksichtigt werden (120 Minuten = 89,2 SCE/Metaphase, 5 Mitosen).

Die SCE-Werte der O-KO liegen zwischen 7,86 und 9,96 SCE/Metaphase. Die SCE-Raten der behandelten Kulturen lagen zwischen 13,24 und 57,02 SCE/Metaphase.

Es ist eine deutliche Zeit-Effekt-Beziehung nachweisbar.

Experiment 5: Perfundiertes Carbamazepin (CBZ), gelöst in DMSO (Tabelle 15)

Die CBZ-Konzentration im Perfusat betrug 350 µg/ml; die DMSO-

Konzentration im Perfusat 3,5 %.

Es wurden drei unabhängige Versuche durchgeführt.

Die SCE-Raten der O-KO liegen zwischen 6,0 und 8,72 SCE/Metaphase. Die SCE-Raten der behandelten Kulturen liegen zwischen 6,24 und 8,29 SCE/Metaphase. Es ist kein Effekt im Vergleich zur O-KO und kein Zeit-Effekt nachweisbar.

Experiment 6: Perfundiertes Carbamazepin (CBZ), gelöst in Ethanol (Tabelle 16)

Die CBZ-Konzentration im Perfusat betrug 350 µg/ml; die der Ethanol-Konzentration 3,5 %.

Die DS wurden zwischen 7 und 240 Minuten im Perfusat belassen. Es wurden vier unabhängige Versuche durchgeführt.

Die SCE-Raten der O-KO liegen zwischen 5,24 und 8,88 SCE/Metaphase. Die SCE-Raten der behandelten Kulturen liegen zwischen 6,31 und 9,58 SCE/Metaphase. Für die behandelten Kulturen ist keine Zeit-Effekt-Beziehung nachweisbar und im Vergleich zu den Kontrollen keine SCE-Erhöhung festzustellen.

Experiment 7: Perfundiertes Disulfiram (Antabus) und Ethanol (Tabelle 17)

Die Disulfiram-Konzentration im Perfusat betrug $1 \cdot 10^{-5}$ M; die Ethanol-Konzentration 3,5 %.

Die DS wurden zwischen 7 und 120 Minuten im Perfusat belassen. Bei Versuch P-17 waren die Kontrollkulturen mit Hefen kontaminiert und nicht auswertbar.

Es wurden drei unabhängige Versuche durchgeführt.

Die SCE-Raten der O-KO betragen 4,93 und 6,69 SCE/Metaphase. Die SCE-Raten der behandelten Kulturen liegen zwischen 7,14 und 11,64 SCE/Metaphase.

Bei Versuch P-16 ist eine geringe, aber kontinuierliche SCE-Erhöhung von 7,20 SCE/Metaphase (7 Minuten Behandlungszeit) auf 11,64 SCE/Metaphase (120 Minuten Behandlungszeit) und zur O-KO (4,93 SCE/Metaphase) erkennbar.

Bei den Versuchen P-17 und P-18 ist keine Zeit-Effekt-Beziehung zwischen den Behandlungszeiten festzustellen.

Mit Hilfe des U-Tests nach WILCOXON und MANN und WHITNEY (SIEGEL, 1956; SACHS, 1968) sollen die Ergebnisse von Versuch P-16 statistisch überprüft werden.

Experimentalserie II: Pulsbehandlung mit S 9-Mix

In den Experimenten dieser Serie wurden 3-Tage- und 4-Tage-Kulturen menschlicher Lymphozyten in vitro mit Testsubstanzen und S 9-Mix behandelt.

In der 45. Kulturstunde wurden die Parallelkulturen mit den Testsubstanzen behandelt und danach wurde eine Kultur direkt mit S 9-Mix (Serie B) und die andere Kultur mit S 9-Mix im Dialyseschlauch (DS; Serie A) behandelt.

Bei Serie A wurde S 9-Mix (12,1 %) im DS zur 45. Kulturstunde zu den Kulturen gegeben und zur 48. Kulturstunde entfernt. In der 72. Kulturstunde wurden die Testsubstanzen ausgewaschen.

Bei Serie B wurde 1 ml S 9-Mix direkt den Kulturen zugegeben (S 9-Konzentration in der Kultur = 2 %). Nach einer Stunde Behandlungszeit wurden die Kulturen gewaschen.

Die Konzentrationen für NADP und G-6-P in den Kulturen waren in beiden Serien gleich (NADP = 1 mM; G-6-P = 2 mM).

Parallelkulturen wurden nicht angesetzt. Aus diesem Grund wurden zwei unabhängige Versuche durchgeführt und, soweit möglich, 40 Mitosen pro Kultur ausgewertet.

Experimentalserie II. A: Pulsbehandlung menschlicher Lymphozyten mit S 9-Mix in Dialyseschläuchen (Tabelle 18)

Beim Vergleich zwischen den CBZ behandelten Kulturen, der O-KO und der DMSO-KO sind keine Effekte festzustellen.

Die SCE-Raten der O-KO betragen 7,13 und 7,18 SCE/Metaphase. Die SCE-Raten der DMSO-Kontrollen betragen 6,83 und 6,93 SCE/

Metaphase. Die SCE-Raten der CBZ-behandelten Kulturen liegen zwischen 6,31 und 7,88 SCE/Metaphase. Die SCE-Raten der CP-behandelten Positiv-KO sind mit 10,13 SCE/Metaphase bei Versuch 1 nur leicht erhöht und bei Versuch 2 mit 14,88 SCE/Metaphase verdoppelt.

Bei Versuch 1 war bei der CBZ-Konzentration von 25 µg/ml fast keine zweiten Mitosen vorhanden.

Experimentalserie II. B; Versuch 1 und 2:

Pulsbehandlung menschlicher Lymphozyten mit S 9-Mix. Direkte Applikation (Tabelle 19)

Die SCE-Raten der CBZ-behandelten Kulturen liegen zwischen 7,17 und 9,45 SCE/Metaphase. Die SCE-Raten der O-KO betragen 7,94 und 7,87 SCE/Metaphase, die der DMSO-KO betragen 8,22 und 8,90 SCE/Metaphase.

Eine Dosisabhängigkeit ist nicht nachweisbar. Im Vergleich zu den Kontrollen sind keine Effekte festzustellen.

Die SCE-Raten der CP-behandelten Positiv-KO sind mit 17,25 und 23,35 SCE/Metaphase im Vergleich zu den Kontrollen verdoppelt bis verdreifacht.

Versuch 3: Pulsbehandlung menschlicher Lymphozyten mit S 9-Mix. Direkte Applikation (Tabelle 20)

Dieses Experiment stellt eine Modifikation von Experiment II.B dar. Das Kulturmedium wurde vor der Behandlung entfernt und die Zellen einmal mit Hank's-Medium gewaschen. Zur 48. Kulturstunde wurden die Zellen mit den Testsubstanzen und einem Aktivierungsgemisch (McCoy's 5 A-Medium, NADP, G-6-P und S 9-Fraktion) eine Stunde lang behandelt.

Die S 9-Konzentration in den Kulturen betrug 1 %.

Nach der Behandlung wurden die Kulturen zweimal mit Hank's-Medium gewaschen und für weitere 24 Stunden mit frischem Vollmedium inkubiert. Die Gesamtinkubationszeit betrug 74 Stunden. Das Experiment wurde einmal mit dem Blut zweier Probanden durchgeführt. Für jeden Untersuchungspunkt wurden 50 Mitosen ausgewertet (25 Mi-

tosen pro Parallelkultur).

Testsubstanzen:

Ethanol (0,5; 1,0 und 1,5 Vol.%)
Ethanol (0,5; 1,0 und 1,5 Vol.%) und Disulfiram ($1 \cdot 10^{-5}$ M)
Cyclophosphamid ($1 \cdot 10^{-5}$; $3,3 \cdot 10^{-5}$ und $1 \cdot 10^{-4}$ M)
Kontrolle

Die Testsubstanzen wurden mit und ohne S 9-Mix getestet. Ohne S 9-Mix wurden Ethanol und Ethanol mit Disulfiram nur in der höchsten Konzentration (1,5 Vol.%) getestet.

Im folgenden werden die Ergebnisse der jeweiligen Kontrollkulturen ohne S 9-Mix in Klammern angegeben.

Die SCE-Raten der BrdU-Kontrollen betragen für Proband A 5,90 SCE/Metaphase (6,96 SCE/Metaphase) und für Proband B 6,76 SCE/Metaphase (5,94 SCE/Metaphase).

Die SCE-Raten der Ethanol-behandelten Kulturen liegen zwischen 5,64 und 7,20 SCE/Metaphase (7,42 SCE/Metaphase) für Proband A und für Proband B zwischen 6,58 und 7,46 SCE/Metaphase (5,98 SCE/Metaphase).

Die SCE-Raten der mit Ethanol und Disulfiram behandelten Kulturen liegen für Proband A zwischen 6,20 und 7,20 SCE/Metaphase (6,72 SCE/Metaphase) und für Proband B zwischen 6,20 und 6,94 SCE/Metaphase (6,40 SCE/Metaphase).

Die SCE-Raten nach CP-Behandlung liegen zwischen 18,36 und 52,54 SCE/Metaphase (6,32 und 6,64 SCE/Metaphase) für Proband A und zwischen 16,16 und 56,70 SCE/Metaphase (5,68 und 6,54 SCE/Metaphase) für Proband B.

Eine Dosisabhängigkeit nach Behandlung mit Ethanol, sowie mit Ethanol und Disulfiram ist bei beiden Blutproben nicht nachweisbar. Alle Werte liegen im Kontrollbereich.

Die SCE-Werte der mit CP und S 9-Mix behandelten Kulturen zeigen bei beiden Probanden eine deutliche Dosisabhängigkeit. Die SCE-Erhöhung ist bei beiden Blutproben sehr ähnlich. Nach Behandlung mit CP ohne S 9-Mix liegen die SCE-Raten im Kontroll-

bereich.

Experimentalserie III: Metabolische Aktivierung mit
Schweineleberhomogenat

Wie in Experimentalserie I. B (Rattenleberperfusion; Rezirkulierendes System) soll in dieser Experimentalserie untersucht werden, ob die SCE-Rate mit der Behandlungsdauer korreliert ist (Zeit-Effekt-Beziehung).

Die Versuche dieser Serie sind daher ähnlich angelegt wie Experimentalserie I. B, wobei die Dialyseschläuche (DS) mit Vollblut in 50 %iges Schweineleberhomogenat gegeben wurden.

Für die verschiedenen Kontrollen und die Testsubstanzen wurde das Homogenat-Cofaktoren-Gemisch vorher aufgeteilt und die DS mit dem Vollblut unterschiedlich lange darin belassen.

Die DS der Kontrollkulturen ohne Leber wurden in Medium TC 199 belassen. Alle Experimente wurden jeweils einmal mit dem Blut von zwei verschiedenen Spendern durchgeführt.

Die DS der Testkulturen wurden bei allen 3 Versuchen 15 bis 60 Minuten in den jeweiligen Testflüssigkeiten belassen.

Im Folgenden werden die Ergebnisse der Kontrollkulturen ohne Schweineleberhomogenat in Klammern angegeben.

Experiment 1: Schweineleberhomogenat mit Carbamazepin (CBZ;
100 µg/ml), gelöst in Ethanol (0,75 Vol.%)

Die Konzentration der CP-KO betrug $1 \cdot 10^{-3}$ M.

Die SCE-Raten der O-KO betragen für Proband I 12,58 SCE/Metaphase (13,64 SCE/Metaphase) und für Proband II 8,13 SCE/Metaphase (8,46 SCE/Metaphase).

Die SCE-Werte der CBZ-behandelten Kulturen liegen zwischen 11,17 und 12,52 SCE/Metaphase (12,52 SCE/Metaphase) für Proband I und für Proband II zwischen 6,56 und 8,7 SCE/Metaphase (8,2 SCE/Metaphase).

Carbamazepin führt unter den Bedingungen dieses Versuches zu keiner Erhöhung der SCE-Raten.

Die SCE-Werte der CP-KO (60 Minuten Behandlungszeit) betragen für Proband I 16,06 SCE/Metaphase und für Proband II 13,19 SCE/Metaphase. Die SCE-Werte der positiven Kontrolle sind für Proband I im Vergleich zur O-KO leicht erhöht und für Proband II fast verdoppelt.

Die CP-behandelten Kulturen (30 Minuten Behandlungszeit) mußten wegen eines Pipettierfehlers verworfen werden. Deshalb sind für diesen Untersuchungspunkt keine Werte vorhanden.

Experiment 2: Schweineleberhomogenat mit Ethanol (0,5 Vol.%)
(Tabelle 22)

Die Konzentration von CP in den Positiv-Kontrollen betrug $1 \cdot 10^{-3}$ M.

Die SCE-Raten der unbehandelten Kontrolle betragen für Proband I 9,84 SCE/Metaphase (11,56 SCE/Metaphase) und für Proband II 7,74 SCE/Metaphase (7,70 SCE/Metaphase).

Die SCE-Raten der mit Ethanol behandelten Kulturen liegen bei Proband I zwischen 11,62 und 13,86 SCE/Metaphase (12,16 SCE/Metaphase) und für Proband II zwischen 7,84 und 9,34 SCE/Metaphase (7,90 SCE/Metaphase).

Im Vergleich zur Kontrolle ist bei keiner Behandlungsdauer eine signifikante SCE-Erhöhung feststellbar.

Die SCE-Raten der CP-Kontrollen betragen für Proband I 16,48 SCE/Metaphase (30 Minuten Behandlung) und 16,44 SCE/Metaphase (60 Minuten Behandlung) und für Proband II 13,98 SCE/Metaphase (30 Minuten Behandlung) und 15,23 SCE/Metaphase (60 Minuten Behandlung). Gegenüber den unbehandelten Kontrollen sind die SCE-Werte der Positiv-Kontrollen bei Proband I nur leicht erhöht und bei Proband II verdoppelt. Die einstündig behandelten CP-Kulturen wiesen sehr wenige 2. Metaphasen auf. Bei Proband I konnten lediglich 9 Metaphasen und bei Proband II 17 Metaphasen analysiert werden.

Experiment 3: Schweineleberhomogenat mit Ethanol (0,5 Vol.%)
und Disulfiram ($1 \cdot 10^{-5}$ M; Tabelle 23)

Die Konzentration von CP in den Positiv-Kontrollen betrug $1 \cdot 10^{-3}$ M.

Die SCE-Werte der unbehandelten Kontrolle betragen für Proband I 13,0 SCE/Metaphase (12,03 SCE/Metaphase) und für Proband II 7,37 SCE/Metaphase (7,40 SCE/Metaphase).

Die SCE-Werte der behandelten Kulturen liegen bei Proband I zwischen 11,33 und 13,06 SCE/Metaphase (10,50 SCE/Metaphase) und bei Proband II zwischen 8,13 und 9,40 SCE/Metaphase (9,40 SCE/Metaphase).

Eine Zeit-Effekt-Beziehung ist für die behandelten Kulturen nicht feststellbar und zu den Kontrollen keine SCE-Erhöhung.

Die Werte der CP-Kontrolle betragen für Proband I 15,0 SCE/Metaphase (30 Minuten) und 19,57 SCE/Metaphase (60 Minuten) und für Proband II 13,73 SCE/Metaphase (30 Minuten) und 17,88 SCE/Metaphase (60 Minuten).

Die SCE-Werte der CP-behandelten Kulturen von Proband I sind im Vergleich zur Kontrolle leicht erhöht, bei Proband II bei 30 Minuten verdoppelt und bei 60 Minuten mehr als verdoppelt.

In diesem Versuch wurde zusätzlich mit CP aber ohne Leberhomogenat eine Stunde lang behandelt. Die SCE-Werte liegen bei Proband I mit 13,38 SCE/Metaphase im Kontrollbereich und sind bei Proband II mit 10,32 SCE/Metaphase nur leicht erhöht.

STATISTIK

Als statistischer Test zur Überprüfung der erhöhten SCE-Werte der beiden Perfusionsversuche mit ETHANOL (P-3; Tabelle 13) und ETHANOL und DISULFIRAM (P-16; Tabelle 17) wurde der U-Test nach WILCOXON, MANN und WHITNEY gewählt (SIEGEL, 1956; SACHS, 1968).

Für diese Untersuchung wurde der einseitige U-Test gewählt. Dieser prüft die Nullhypothese $\mu_A = \mu_B$ gegen die Alternativhypothese $\mu_A > \mu_B$

Zur Berechnung der Prüfgröße U bringt man die Stichprobenwerte (m + n) in eine gemeinsame aufsteigende Rangfolge, wobei zu jeder Rangzahl vermerkt wird, aus welcher der beiden Stichproben der dazugehörige Wert stammt.

Die Summe der auf Stichprobe 1 entfallenden Rangzahlen = R_1 ,
die Summe der auf Stichprobe 2 entfallenden Rangzahlen = R_2 .

Die Prüfgröße U wird nach folgender Formel berechnet:

$$U_1 = mn + \frac{m(m+1)}{2} - R_1$$

$$U_2 = mn + \frac{n(n+1)}{2} - R_2$$

$$\text{Kontrollrechnung: } U_1 + U_2 = mn$$

Da die Summen der Stichprobenumfänge (m + n > 60) waren, wurden die Meßergebnisse mit Hilfe der Approximation

$$\hat{z} = \frac{\left| U - \frac{mn}{2} \right|}{\sqrt{\frac{mn(m+n+1)}{12}}}$$

getestet.

Der erhaltene Wert $\hat{z}$ wird anhand der Standardnormalverteilung beurteilt.

Ist der gefundene Wert $\hat{z} \geq 1,65$, ist das Ergebnis der behandelten Kulturen zu der Kontrollkultur signifikant erhöht.

In der nachfolgenden Tabelle sind die Werte der statistischen Berechnung der beiden Versuch P-3 und P-16 zusammengestellt.

Tabelle : U-Test nach Wilcoxon, Mann und Whitney
 Test der Hypothese $\mu_A = \mu_B$ gegen
 die Alternative $\mu_A > \mu_B$

Testsubstanz	Behandlungszeit (Minuten)	U ₁	U ₂	$\hat{z}$
<u>ETHANOL</u>	7	1297	1203	0,324
Versuch	15	-	-	-
P-3	30	1071	979	0,369
Tabelle	60	1562,5	937,5	2,154
13	120	1534	966	1,958
<u>ETHANOL + DISULFIRAM</u>	7	964	386	3,09
Versuch	15	1074	276	4,26
P-16	30	1219,5	140,5	5,70
Tabelle	60	1185,5	164,5	5,45
17	120	559	35	5,27

ÜBERSICHT DER ERGEBNISTABELLEN

Tabelle Nr.	Testsubstanz	Seite
<u>EXPERIMENTALSERIE I. A:</u>		
Rattenleberperfusion - Offenes System		
5 :	DMSO	72
6 :	Carbamazepin, gelöst in DMSO	73
7 :	Carbamazepin, gelöst in Ethanol	74
8 :	Cyclophosphamid	75
9 :	unterschiedlich perfundierte Carbamazepin-Konzentrationen, gelöst in Ethanol	76
10 :	unterschiedlich perfundierte Cyclophosphamid-Konzentrationen	77
<u>EXPERIMENTALSERIE I. B:</u>		
Rattenleberperfusion - Rezirkulierendes System		
11 :	Tyrode-Lösung + HXS	78
12 :	DMSO	79
13 :	Ethanol	80
14 :	Cyclophosphamid	82
15 :	Carbamazepin, gelöst in DMSO	83
16 :	Carbamazepin, gelöst in Ethanol	84
17 :	Disulfiram, gelöst in Ethanol	86
<u>EXPERIMENTALSERIE II:</u>		
Behandlung der Lymphozyten mit S 9-Mix		
18 :	II. A: S 9-Mix in Dialyseschläuchen Carbamazepin, gelöst in DMSO	88
19 :	II. B: Direkte S 9-Applikation Carbamazepin, gelöst in DMSO	89
20 :	II. B: Cyclophosphamid, Ethanol, Ethanol + Disulfiram	90
<u>EXPERIMENTALSERIE III:</u>		
Schweineleberhomogenat		
21 :	Carbamazepin, gelöst in Ethanol	92
22 :	Ethanol	93
23 :	Ethanol und Disulfiram	94

Tabelle 5:

LEBERPERFUSION - OFFENES SYSTEM
 Experimentalserie I. A; Experiment 1
 SCE-Häufigkeiten in menschlichen Lymphozyten nach in vitro-
 Behandlung mit perfundiertem DMSO.
 Jeweils 2 ml der perfundierten Lösung wurden auf stimulierte
 5 ml-Kulturen gegeben.
 Die DMSO-Konzentration betrug 1 % in der Kultur.
 Behandlung nach 45 Stunden Inkubationszeit
 Behandlungsdauer: 3 Stunden
 Kulturdauer: 96 Stunden einschließlich 6 Stunden Colcemid-
 Behandlung

Behandlung	Anzahl analy- sierter Meta- phasen	Perfusions-Nr. P-2	SCE-Rate pro Metaphase	+ SE
0 - K0	50		6,36	0,37
DMSO	100		6,84	0,32

Tabelle 6:

LEBERPERFUSION - OFFENES SYSTEM

Experimentalserie I. A; Experiment 2

SCE-Häufigkeiten in menschlichen Lymphozyten nach in vitro-Behandlung mit perfundiertem CARBAMAZEPIN (CBZ), gelöst in DMSO

CBZ-Konzentration im Perfusat = 350 µg/ml; DMSO-Konzentration im Perfusat = 1 %

Behandlung nach 45 Stunden Inkubationszeit

Behandlungsdauer: 3 Stunden

Kulturdauer: 96 Stunden einschließlich 6 Stunden Colcemid-Behandlung

CBZ-Konzentration µg/ml	Perfusions-Nr. P-9			Perfusions-Nr. P-10			Perfusions-Nr. P-11		
	Anzahl analysierter Metaphasen	SCE-Rate pro Metaphase	± SE	Anzahl analysierter Metaphasen	SCE-Rate pro Metaphase	± SE	Anzahl analysierter Metaphasen	SCE-Rate pro Metaphase	± SE
0-K0	50	7,68	0,71	-	-	-	50	7,42	0,52
12,5 *)	50	6,16	0,43	15	5,87	0,63	48	7,67	0,57
25,0 *)	50	6,98	0,45	-	-	-	50	7,16	0,44
50,0 *)	50	6,48	0,37	38	5,24	0,38	49	6,78	0,43
100,0 °)	50	7,92	0,44	35	5,86	0,37	50	6,82	0,41

*) mit Medium TC 199 hergestellte Verdünnung

°) berechnet nach der CBZ-Menge im Perfusat

Tabelle 7:

LEBERPERFUSION - OFFENES SYSTEM

Experimentalserie I. A; Experiment 3

SCE-Häufigkeiten in menschlichen Lymphozyten nach in vitro-Behandlung mit perfundiertem CARBAMAZEPIN (CBZ), gelöst in ETHANOL

CBZ-Konzentration im Perfusat = 350 µg/ml; Ethanol-Konzentration im Perfusat = 3,5 %

Behandlung nach 45 Stunden Inkubationszeit

Behandlungsdauer: 3 Stunden

Kulturdauer: 96 Stunden einschließlich 6 Stunden Colcemid-Behandlung

CBZ-Konzentration µg/ml	Perfusions-Nr. P-12			Perfusions-Nr. P-13			Perfusions-Nr. P-14		
	Anzahl analysierter Metaphasen	SCE-Rate pro Metaphase	± SE	Anzahl analysierter Metaphasen	SCE-Rate pro Metaphase	± SE	Anzahl analysierter Metaphasen	SCE-Rate pro Metaphase	± SE
0-K0	50	5,74	0,34	32	5,25	0,39	16	6,88	0,68
12,5 *)	50	5,38	0,26	-	-	-	13	4,85	0,53
25,0 *)	50	5,90	0,47	19	5,63	0,60	29	7,07	0,67
50,0 *)	50	6,52	0,41	-	-	-	18	6,72	0,68
100,0 °)	50	6,34	0,47	19	5,84	0,48	31	6,55	0,55

*) mit Medium TC 199 hergestellte Verdünnung

°) berechnet nach der CBZ-Menge im Perfusat

Tabelle 8:

LEBERPERFUSION - OFFENES SYSTEM

Experimentalserie I. A.; Experiment 4

SCE-Häufigkeiten in menschlichen Lymphozyten nach in vitro-Behandlung mit perfundiertem CYCLOPHOSPHAMID (CP), gelöst in Tyrode-Lösung + HAS

Versuch P-6: CP-Konzentration im Perfusat = $3,5 \cdot 10^{-3}$ M

Versuch P-7: CP-Konzentration im Perfusat = $1,0 \cdot 10^{-3}$ M

Behandlung nach 45 Stunden Inkubationszeit

Behandlungsdauer: 3 Stunden

Kulturdauer: 96 Stunden einschließlich 6 Stunden Colcemid-Behandlung

CP-Konzentration 10 ⁻³ M	Perfusions-Nr. P-6			CP-Konzentration 10 ⁻³ M	Perfusions-Nr. P-7		
	Anzahl analysierter Metaphasen	SCE-Rate pro Metaphase	± SE		Anzahl analysierter Metaphasen	SCE-Rate pro Metaphase	± SE
0-K0	50	6,42	0,33	0-K0	50	8,30	0,54
0-K0	50	7,40	0,57				
0,125 ^{*)}	49	28,06	1,40	0,035 ^{*)}	50	8,70	0,55
0,250 ^{*)}	40	44,88	2,04	0,071 ^{*)}	50	10,86	0,66
0,500 ^{o)}	24	73,88	4,01	0,143 ^{*)}	50	10,42	0,46
				0,286 ^{o)}	50	22,52	1,22

^{*)} mit Medium TC 199 hergestellte Verdünnung

^{o)} berechnet nach der CP-Menge im Perfusat

Tabelle 9:

LEBERPERFUSION - OFFENES SYSTEM
 Experimentalserie I. A; Experiment 5
 SCE-Häufigkeiten in menschlichen Lymphozyten nach in vitro-
 Behandlung mit unterschiedlich perfundierten Konzentrationen
 von CARBAMAZEPIN (CBZ), gelöst in ETHANOL
 Jeweils 2 ml der perfundierten Lösung wurden auf stimulierte
 5 ml-Kulturen gegeben. Die Konzentrationen errechnen sich
 nach der CBZ-Menge im Perfusat
 Behandlung nach 45 Stunden Inkubationszeit
 Behandlungsdauer: 3 Stunden
 Kulturdauer: 96 Stunden einschließlich 6 Stunden
 Colcemid-Behandlung

CBZ - Konzentration µg/ml	Perfusions-Nr. P-15		
	Anzahl ana- lysierter Metaphasen	SCE-Rate pro Metaphase	± SE
0-K0	50	7,42	0,48
12,5	50	7,34	0,45
25,0	50	6,80	0,58
50,0	50	7,74	0,48
100,0	50	6,24	0,60

Tabelle 10:

LEBERPERFUSION - OFFENES SYSTEM
Experimentalserie I. A; Experiment 6

SCE-Häufigkeiten in menschlichen Lymphozyten nach in vitro-Behandlung mit unterschiedlich perfundierten Konzentrationen von CYCLOPHOSPHAMID (CP), gelöst in Tyrode-Lösung + HAS

Jeweils 2 ml der perfundierten Lösung wurden auf stimulierte 5 ml-Kulturen gegeben. Die Konzentrationen errechnen sich nach der CP-Menge im Perfusat.

Behandlung nach 45 Stunden Inkubationszeit

Behandlungsdauer: 3 Stunden

Kulturdauer: 96 Stunden einschließlich 6 Stunden

Colcemid-Behandlung

CP-Konzentration 10 ⁻³ M	Perfusions-Nr. P-8	
	Anzahl analysierter Metaphasen	SCE-Rate pro Metaphase
0-KO	20	7,85
CP-KO *	50	7,20
0,125	50	17,50
0,250	50	22,28
0,500	50	32,40
1,000	30	39,26
		0,81
		0,44
		0,99
		0,96
		2,08
		3,00

* CP wurde direkt zu den Kulturen gegeben (ohne Aktivierung)

Tabelle 11:

LEBERPERFUSION - REZIRKULIERENDES SYSTEM
 Experimentalserie I. B; Experiment 1
 SCE-Häufigkeiten in menschlichen Lymphocyten nach in vitro-
 Behandlung mit perfundierter Tyrode-Lösung+ H₂S
 (Perfusions-Kontrolle)
 1,5 ml Vollblut wurden mittels Dialyseschläuchen im
 Perfusat inkubiert
 Kulturdauer: 72 Stunden einschließlich 6 Stunden
 Colcemid-Behandlung

Behandlungs- zeit in Minuten	Perfusions-Nr. P-1		+ SE
	Anzahl ana- lysierter Metaphasen	SCE-Rate pro Metaphase	
7	126	6,02	0,24
15	100	7,33	0,33
30	108	6,42	0,26
60	130	6,92	0,31
120	90	6,12	0,26

Tabelle 12:

LEBERPERFUSION - REZIRKULIERENDES SYSTEM

Experimentalserie I. B; Experiment 2

SCE-Häufigkeiten in menschlichen Lymphozyten nach in vitro-Behandlung mit perfundiertem DMSO
DMSO-Konzentration im Perfusat = 3,5 %

1,5 ml Vollblut wurden mittels Dialyseschläuchen im Perfusat inkubiert.

Die Kontrollen wurden bei 37° C in Medium TC 199 belassen.

Kulturdauer: 72 Stunden einschließlich 6 Stunden Colcemidbehandlung

Behandlungszeit in Minuten	<u>Perfusions-Nr. P-2</u>		
	Anzahl ana- lysierter Metaphasen	SCE-Rate pro Metaphase	+ SE
0-K0 120	27	6,15	0,51
0-K0 240	50	8,42	0,53
7	50	6,98	0,46
15	50	7,26	0,49
30	50	6,88	0,55
60	32	8,38	0,71
120	37	7,00	0,54
240	50	7,90	0,52

Tabelle 13:

LEBERPERFUSION - REZIRKULIERENDES SYSTEM

Experimentalserie I. B; Experiment 3

SCE-Häufigkeiten in menschlichen Lymphozyten nach in vitro-Behandlung mit perfundiertem ETHANOL
ETHANOL-Konzentration im Perfusat = 3,5 %1,5 ml Vollblut wurden mittels Dialyseschläuchen im Perfusat inkubiert.
Die Kontrollen wurden bei 37° C in Medium TC 199 belassen.

Kulturdauer: 72 Stunden einschließlich 6 Stunden Colcemid-Behandlung

Behandlungs- zeit in Minuten	Perfusions-Nr. P-3			Perfusions-Nr. P-4			Perfusions-Nr. P-5		
	Anzahl analy- sierter Meta- phasen	SCE-Rate pro Metaphase	+ SE	Anzahl analy- sierter Meta- phasen	SCE-Rate pro Metaphase	+ SE	Anzahl analy- sierter Meta- phasen	SCE-Rate pro Metaphase	+ SE
0-KO 120	50	7,36	0,45	-	-	-	27	4,93	0,40
7	50	7,78	0,57	150	8,19	0,26	25	6,24	0,49
15	-	-	-	150	7,56	0,26	50	4,94	0,50
30	41	7,51	0,48	196	7,84	0,23	32	6,47	0,34
60	50	8,90	0,53	150	7,09	0,29	34	7,97	0,63
120	50	9,20	0,63	150	7,37	0,28	-	-	-

Fortsetzung Tabelle 13:

Mittlung der Ergebnisse der Versuche P-3 bis P-5		
Behandlungs- zeit in Minuten	Anzahl ana- lysierter Metaphasen	SCE-Rate pro Metaphase
0-K0 120	77	6,51
7	225	7,88
15	200	6,91
30	269	7,63
60	234	7,60
120	200	7,82

Tabelle 14:

LEBERPERFUSION - REZIRKULIERENDES SYSTEM

Experimentalserie I. B; Experiment 4

SCE-Häufigkeiten in menschlichen Lymphozyten nach in vitro-Behandlung mit perfundiertem CYCLOPHOSPHAMID (CP), gelöst in Tyrode-Lösung + HKS

1,5 ml Vollblut wurden mittels Dialyseschläuchen im Perfusat inkubiert

Die Kontrollen wurden bei 37° C in Medium TC 199 belassen.

Die CP-Konzentration im Perfusat betrug 1·10⁻³ M

Kulturdauer: 72 Stunden einschließlich 6 Stunden Colcemid-Behandlung

Behandlungs- zeit in Minuten	Perfusions-Nr. P-7			Perfusions-Nr. P-8		
	Anzahl analy- sierter Meta- phasen	SCE-Rate pro Metaphase	+ SE	Anzahl analy- sierter Meta- phasen	SCE-Rate pro Metaphase	+ SE
0-K0 60	27	9,63	0,65	50	9,96	0,75
0-K0 120	-	-	-	50	7,86	0,57
7	50	13,24	0,62	19	30,63	1,98
15	50	17,60	0,74	15	30,06	2,26
30	50	29,78	0,93	44	51,20	1,67
60	42	57,02	1,78	-	-	-

Tabelle 15:

LEBERPERFUSION - REZIRKULIERENDES SYSTEM

Experimentalserie I. B; Experiment 5

SCE-Häufigkeiten in menschlichen Lymphozyten nach in vitro-Behandlung mit perfundiertem
 CARDAMAZEPIN (CBZ), gelöst in DMSO

CBZ-Konzentration im Perfusat = 350 µg/ml; DMSO-Konzentration = 3,5 %

1,5 ml Vollblut wurden mittels Dialyseschläuchen im Perfusat inkubiert.

Die Kontrollen wurden bei 37° C in Medium TC 199 belassen.

Kulturdauer: 72 Stunden einschließlich 6 Stunden Colcemid-Behandlung

Behandlungs- zeit in Minuten	Perfusions-Nr. P-9			Perfusions-Nr. P-10			Perfusions-Nr. P-11		
	Anzahl analy- sierter Meta- phasen	SCE-Rate pro Metaphase	+ SE	Anzahl analy- sierter Meta- phasen	SCE-Rate pro Metaphase	+ SE	Anzahl analy- sierter Meta- phasen	SCE-Rate pro Metaphase	+ SE
0-K0 60	-	-	-	-	-	-	50	8,06	0,56
0-K0 120	33	7,94	0,66	30	7,00	0,59	50	8,72	0,76
0-K0 240	12	6,25	0,85	23	6,00	0,39	-	-	-
7	30	5,77	0,45	13	6,62	0,62	50	7,48	0,45
15	-	-	-	21	6,24	0,59	50	8,08	0,43
30	14	6,71	0,73	22	7,18	0,63	50	7,78	0,53
60	-	-	-	-	-	-	50	7,74	0,54
120	-	-	-	14	6,43	0,67	35	8,29	0,60

Tabelle 16:

LEBERPERFUSION - REZIRKULIERENDES SYSTEM

Experimentalserie I. B; Experiment 6

SCE-Häufigkeiten in menschlichen Lymphozyten nach in vitro-Behandlung mit perfundiertem CARBAMAZEPIN (CBZ), gelöst in ETHANOL

CBZ-Konzentration im Perfusat = 350 µg/ml; Ethanol-Konzentration = 3,5 %

1,5 ml Vollblut wurden mittels Dialyseschläuchen im Perfusat inkubiert.

Die Kontrollen wurden bei 37° C in Medium TC 199 belassen.

Kulturdauer: 72 Stunden einschließlich 6 Stunden Colcemid-Behandlung

Behandlungs- zeit in Minuten	Perfusions-Nr. P-12			Perfusions-Nr. P-13		
	Anzahl analy- sierter Meta- phasen	SCE-Rate pro Metaphase	+ SE	Anzahl analy- sierter Meta- phasen	SCE-Rate pro Metaphase	+ SE
0-K0 60	-	-	-	-	-	-
0-K0 120	50	5,24	0,39	46	7,20	0,49
0-K0 240	-	-	-	23	6,74	0,44
7	-	-	-	43	7,93	0,44
15	-	-	-	50	7,00	0,48
30	50	7,06	0,46	46	6,61	0,41
60	50	7,45	0,55	31	7,29	0,55
120	50	6,86	0,43	35	6,74	0,41
240	24	7,29	0,57	-	-	-

Fortsetzung Tabelle 16:

Behandlungs- zeit in Minuten	Perfusions-Nr. P-14			Perfusions-Nr. P-15		
	Anzahl analy- sierter Meta- phasen	SCE-Rate pro Metaphase	+ SE -	Anzahl analy- sierter Meta- phasen	SCE-Rate pro Metaphase	+ SE -
0-K0 60	-	-	-	50	8,88	0,57
0-K0 120	-	-	-	50	8,04	0,48
0-K0 240	26	6,31	0,57	-	-	-
7	17	6,35	0,60	50	8,60	0,42
15	-	-	-	50	7,46	0,45
30	11	7,82	0,77	50	8,44	0,41
60	-	-	-	50	8,66	0,46
120	-	-	-	50	9,58	0,59
240	-	-	-	-	-	-

Tabelle 17:

LEBERPERFUSION - REZIRKULIERENDES SYSTEM

Experimentalserie I. B; Experiment 7

SCE-Häufigkeiten in menschlichen Lymphozyten nach in vitro-Behandlung mit perfundiertem DISULFIRAM, gelöst in ETHANOL

Disulfiram-Konzentration im Perfusat = $1 \cdot 10^{-5}$ M; Ethanolkonzentration = 3,5 %

1,5 ml Vollblut wurden mittels Dialyseschläuchen im Perfusat inkubiert.

Die Kontrollen wurden bei 37° C in Medium TC 199 inkubiert.

Kulturdauer: 72 Stunden einschließlich 6 Stunden Colcemid-Behandlung.

Behandlungs- zeit in Minuten	Perfusions-Nr. P-16			Perfusions-Nr. P-17			Perfusions-Nr. P-18		
	Anzahl analy- sierter Meta- phasen	SCE-Rate pro Metaphase	+ SE	Anzahl analy- sierter Meta- phasen	SCE-Rate pro Metaphase	+ SE	Anzahl analy- sierter Meta- phasen	SCE-Rate pro Metaphase	+ SE
0-K0 120	27	4,93	0,40	-	-	-	84	6,69	0,37
7	50	7,20	0,45	132	7,14	0,30	83	8,36	0,44
15	50	7,88	0,40	82	7,20	0,40	36	7,28	0,54
30	50	9,76	0,47	83	7,16	0,31	71	7,72	0,34
60	50	9,28	0,47	34	7,71	0,42	86	8,56	0,43
120	22	11,64	0,91	56	7,55	0,46	10	7,90	0,64

Fortsetzung Tabelle 17:

Mittlung der Ergebnisse der Versuche P-16 bis P-18		
Behandlungszeit in Minuten	Anzahl ana- lysierter Metaphasen	SCE-Rate pro Metaphase
0-K0 120	111	6,26
7	265	7,53
15	168	7,42
30	204	7,99
60	170	8,60
120	88	8,61

Tabelle 18:

EXPERIMENTALSERIE II. A

SCE-Häufigkeiten in menschlichen Lymphozyten nach in vitro-Behandlung mit CARBAMAZEPIN (CBZ) und S 9-MIX (in Dialyseschläuchen (DS))

S 9-Mix-Konzentration im Dialyseschlauch = 12,1 % (2 % in der Kultur)

Behandlung mit CBZ und S 9-Mix nach 45 Stunden Inkubationszeit.

Die DS mit S 9-Mix wurden nach 3 Stunden aus den Kulturen entfernt, CBZ wurde nach 24 Stunden ausgewaschen.

Kulturdauer: 102 Stunden einschließlich 6 Stunden Colcemid-Behandlung

Testsubstanz Konzentration $\mu\text{g/ml}$	Versuch 1		Versuch 2	
	Anzahl analy- sierter Meta- phasen	SCE-Rate pro Metaphase + SE	Anzahl analy- sierter Meta- phasen	SCE-Rate pro Metaphase + SE
O-KO	40	7,18	40	7,13
KO-DMSO	40	6,93	40	6,83
KO-CP ($5 \cdot 10^{-6}$ M)	40	10,13	40	14,88
CBZ 12,5	40	7,65	40	7,13
CBZ 25,0	-	-	19	6,31
CBZ 50,0	29	7,75	40	7,88
CBZ 100,0	40	7,23	26	7,34

CP = Cyclophosphamid

Tabelle 19:

EXPERIMENTALSERIE II. B

SCE-Häufigkeiten in menschlichen Lymphozyten nach in vitro-Behandlung mit CARBAMAZEPIN (CBZ) und S 9-MIX (direkte Applikation)

S 9-Mix Konzentration in der Kultur = 2 %

Behandlung nach 45 Stunden Inkubationszeit für 1 Stunde

Kulturdauer: 102 Stunden einschließlich 6 Stunden Colcemid-Behandlung

Testsubstanz Konzentration $\mu\text{g/ml}$	Versuch 1		Versuch 2	
	Anzahl analy- sierter Meta- phasen	SCE-Rate pro Metaphase $\pm$ SE	Anzahl analy- sierter Meta- phasen	SCE-Rate pro Metaphase $\pm$ SE
O-KO	34	7,94 0,48	40	7,87 0,58
KO-DMSO	40	8,22 0,60	40	8,90 0,68
KO-CP ($5 \cdot 10^{-6}$ M)	16	17,25 1,52	40	23,35 1,20
CBZ 12,5	40	9,45 0,83	30	7,53 0,62
CBZ 25,0	40	6,93 0,54	23	7,17 0,72
CBZ 50,0	40	8,55 0,60	26	8,85 0,66
CBZ 100,0	32	8,41 0,67	40	7,85 0,57

CP = Cyclophosphamid

Tabelle 20: EXPERIMENTALSERIE II. B; Versuch 3

SCE-Häufigkeiten in menschlichen Lymphozyten nach in vitro-Behandlung mit ETHANOL, S 9-MIX, sowie mit ETHANOL, DISULFIRAM und S 9-MIX (direkte Applikation)

S 9-Mix Konzentration in der Kultur: 1 %

Behandlung nach 48 Stunden Inkubationszeit; Behandlungsdauer: 1 Stunde

Kulturdauer: 74 Stunden einschließlich 4,5 Stunden Colcemid-Behandlung

Testsubstanz Konzentration	S 9-Mix	Blut von Proband A			Blut von Proband B		
		Anzahl analy- sierter Meta- phasen	SCE-Rate pro Metaphase	+ SE	Anzahl analy- sierter Meta- phasen	SCE-Rate pro Metaphase	+ SE
O-KO	-	50	6,96	0,39	50	5,94	0,34
CP-KO 1·10 ⁻⁵ M	-	50	6,64	0,37	50	5,68	0,35
CP-KO 3,3·10 ⁻⁵ M	-	50	6,32	0,33	50	6,38	0,37
CP-KO 1·10 ⁻⁴ M	-	50	6,40	0,32	50	6,54	0,41
ETH-KO 1,5 Vol. %	-	50	7,42	0,46	50	5,98	0,33
ETH-KO 1,5 Vol. % + DIS (10 ⁻⁵ M)	-	50	6,72	0,37	50	6,40	0,32
O-KO	+	50	5,90	0,36	50	6,76	0,40
CP-KO 1·10 ⁻⁵ M	+	50	18,36	0,87	50	16,16	0,75
CP-KO 3,3·10 ⁻⁵ M	+	50	28,14	1,25	50	31,74	1,00
CP-KO 1·10 ⁻⁴ M	+	50	52,54	2,08	50	56,70	2,15

CP = Cyclophosphamid; ETH = Ethanol; DIS = Disulfiram

Fortsetzung Tabelle 20:

Testsubstanz Konzentration	S 9-Mix	Blut von Proband A			Blut von Proband B		
		Anzahl analy- sierter Meta- phasen	SCE-Rate pro Metaphase	+ SE	Anzahl analy- sierter Meta- phasen	SCE-Rate pro Metaphase	+ SE
ETH 0,5 Vol. %	+	50	7,20	0,40	50	6,58	0,35
ETH 1,0 Vol. %	+	50	5,64	0,43	50	7,28	0,41
ETH 1,5 Vol. %	+	50	6,02	0,38	50	7,46	0,47
ETH 0,5 Vol. % + DIS (10^{-5} M)	+	50	7,20	0,40	50	6,20	0,34
ETH 1,0 Vol. % + DIS (10^{-5} M)	+	50	6,20	0,37	50	6,70	0,43
ETH 1,5 Vol. % + DIS (10^{-5} M)	+	50	6,54	0,44	50	6,94	0,46

CP = Cyclophosphamid

ETH = Ethanol

DIS = Disulfiram

Tabelle 21: EXPERIMENTALSERIE III; Experiment 1

SCE-Häufigkeiten in menschlichen Lymphozyten nach in vitro-Behandlung mit SCHWEINELEBERHOMOGENAT und CARBAMAZEPIN (CBZ) gelöst in ETHANOL
 CBZ-Konzentration im Homogenat = 100 µg/ml
 Ethanol-Konzentration im Homogenat = 0,75 Vol.-%
 1,2 ml Vollblut wurden mittels Dialyseschläuchen im Homogenat inkubiert
 Kulturdauer: 78 Stunden einschließlich 4,5 Stunden Colcemid-Behandlung

Testsubstanz	Leber	Behandlungszeit in Minuten	Blut von Proband I			Blut von Proband II		
			Anzahl analy- sierter Meta- phasen	SCE-Rate pro Metaphase	+ SE	Anzahl analy- sierter Meta- phasen	SCE-Rate pro Metaphase	+ SE
O-KO	-	60	50	13,64	0,74	50	8,46	0,51
CBZ	-	60	50	12,52	0,66	50	8,20	0,47
O-KO	+	60	50	12,58	0,79	48	8,13	0,51
CP ($1 \cdot 10^{-3}$ M)	+	60	18	16,06	1,02	27	13,19	1,00
CBZ	+	15	50	12,52	0,62	50	8,70	0,42
CBZ	+	30	46	11,17	0,76	50	6,80	0,42
CBZ	+	45	50	11,38	0,57	50	7,64	0,42
CBZ	+	60	50	11,80	0,62	50	6,56	0,41

CP = Cyclophosphamid

Tabelle 22:

EXPERIMENTALSERIE III; Experiment 2

SCE-Häufigkeiten in menschlichen Lymphozyten nach in vitro-Behandlung mit
SCHWEINELEBERHOMOGENAT und ETHANOL (ETH)
Ethanol-Konzentration im Homogenat = 0,5 Vol. %

1,2 ml Vollblut wurden mittels Dialyseschläuchen im Homogenat inkubiert
Kulturdauer: 78 Stunden einschließlich 4,5 Stunden Colcemid-Behandlung

Testsubstanz	Leber	Behandlungs- zeit in Minuten	Blut von Proband I			Blut von Proband II		
			Anzahl analy- sierter Meta- phasen	SCE-Rate pro Metaphase	+ SE -	Anzahl analy- sierter Meta- phasen	SCE-Rate pro Metaphase	+ SE -
O-KO	-	60	50	11,56	0,68	50	7,70	0,56
ETH-KO	-	60	50	12,16	0,71	50	7,90	0,39
O-KO	+	60	31	9,84	0,69	50	7,74	0,39
CP ($1 \cdot 10^{-3}$ M)	+	30	50	16,48	0,88	50	13,98	0,52
CP ($1 \cdot 10^{-3}$ M)	+	60	9	16,44	1,56	17	15,23	1,06
ETH	+	15	50	11,62	0,80	50	7,84	0,39
ETH	+	30	50	13,86	0,70	50	8,80	0,56
ETH	+	45	50	12,52	0,80	50	8,04	0,50
ETH	+	60	39	12,15	0,80	50	9,34	0,48

CP = Cyclophosphamid

Tabelle 23:

EXPERIMENTALSERIE III; Experiment 3

SCE-Häufigkeiten in menschlichen Lymphozyten nach in vitro-Behandlung mit SCHWEINELEBERHOMOGENAT und ETHANOL (ETH) und DISULFIRAM (DIS)
Ethanol-Konzentration im Homogenat = 0,5 Vol.-%
Disulfiram-Konzentration im Homogenat = $1 \cdot 10^{-5}$ M

1,2 ml Vollblut wurden mittels Dialyseschläuchen im Homogenat inkubiert
Kulturdauer: 78 Stunden einschließlich 4,5 Stunden Colcemid-Behandlung

Testsubstanz	Leber	Behandlungszeit in Minuten	Blut von Proband I			Blut von Proband II		
			Anzahl analy- sierter Meta- phasen	SCE-Rate pro Metaphase	+ SE	Anzahl analy- sierter Meta- phasen	SCE-Rate pro Metaphase	+ SE
O-KO	-	60	38	12,03	0,94	50	7,40	0,47
ETH + DIS - KO	-	60	50	10,50	0,73	50	9,40	0,44
O-KO	+	60	22	13,00	1,47	30	7,37	0,51
CP ($1 \cdot 10^{-3}$ M)	-	60	34	13,38	1,01	50	10,32	0,58
CP ($1 \cdot 10^{-3}$ M)	+	30	14	15,00	1,44	45	13,73	0,53
CP ($1 \cdot 10^{-3}$ M)	+	60	28	19,57	1,51	48	17,88	0,90
ETH + DIS	+	15	50	13,06	0,80	50	9,02	0,61
ETH + DIS	+	30	39	11,33	0,66	50	8,36	0,56
ETH + DIS	+	45	22	12,50	1,10	50	9,40	0,57
ETH + DIS	+	60	17	12,00	1,12	40	8,13	0,52

CP = Cyclophosphamid

DISKUSSION

Viele chemische Substanzen haben erst nach einer metabolischen Aktivierung eine mutagene Wirkung. Der Nachweis solcher indirekt wirkender Mutagene ist in in vitro-Tests nur nach Zusatz metabolisierender Systeme möglich (siehe MADLE und OBE (1980) und BARTSCH et al. (1982)).

Vorteile der in vitro-Metabolisierung sind definierte Konzentrationen von Testsubstanzen, definierte Behandlungszeiten und eine Metabolisierung der Testsubstanz direkt in der Zellkultur; zudem können kurzlebige Metabolite erfaßt werden, die bei in vivo-Experimenten die Targetzellen eventuell gar nicht erreichen.

Der Einsatz von Metabolisierungssystemen in vitro kann in vivo-Untersuchungen nicht überflüssig machen, führt aber zur Einsparung von Tierversuchen.

In der vorliegenden Arbeit wurden drei Substanzen

- 1) Carbamazepin (CBZ)
- 2) Ethanol
- 3) Cyclophosphamid (CP)

mit drei metabolisierenden Systemen

- a) Rattenleberperfusion
- b) Lebermikrosomen (S 9-Mix)
- c) Schweineleberhomogenat

untersucht.

KONTROLLEN

Zu allen Experimenten wurden Nullkontrollen und Lösungsmittelkontrollen angesetzt. Als Lösungsmittel für CBZ wurden Ethanol und DMSO verwendet. Die Ergebnisse mit Ethanol sollen gesondert diskutiert werden.

Bei den Perfusionsversuchen wurde auch die Perfusionslösung perfundiert und getestet (Tabelle 11).

Die Tabellen(Nr. 5-10 und 12-23) zeigen, daß die SCE-Raten der Null- und Lösungsmittelkontrollen aller Versuche mit einer Schwankung von 5 bis 9 SCE/Metaphase im Bereich der in der Literatur angegebenen Werte liegen (BEEK und OBE, 1975; ALHADEFF und COHEN, 1976; DEKNUDT und KAMRA, 1983).

Die Variabilität der spontanen SCE-Raten läßt sich durch die Verwendung von Blut verschiedener Spender erklären. Die spontane SCE-Rate ist individuell unterschiedlich und über einen längeren Zeitraum nicht konstant (CARRANO et al., 1980). Bei den Versuchen mit Schweineleberhomogenat war bei Proband I (SCE/Metaphase = 11,56) eine relativ hohe spontane SCE-Rate zu beobachten. Die spontane SCE-Rate wird durch den jeweiligen Gesundheitszustand, den Ernährungszustand und die Lebensgewohnheiten (Zigaretten- und Alkoholkonsum) beeinflusst (OBE und NATARAJAN, 1980; OBE, 1981; WULF et al., 1984).

CARBAMAZEPIN (CBZ)

Die SCE-Raten der CBZ behandelten Kulturen sind, wie auch aus den Tabellen Nr. 6, 7, 9, 15, 16, 18, 19 und 21 hervorgeht, in allen Testsystemen gegenüber den Kontrollkulturen nicht erhöht.

CBZ ist stark lipophil und wird im Körper zu 95 Prozent metabolisiert (FAIGLE et al., 1976). CBZ kann auf zwei unterschiedlichen Wegen zu hydrophilen Metaboliten verstoffwechselt werden, wobei bei einem der Reaktionswege ein Epoxid (10.11-Epoxycarbamazepin (CBZ-EP) entsteht, das mutagen wirken könnte (siehe Einleitung, Seite 28).

HERHA und OBE (1976,1977) fanden bei Epileptikern, die mit CBZ und Diphenylhydantoin in Mono- und Kombinationstherapie behandelt wurden, eine Erhöhung chromosomaler Aberrationen. Eine nachfolgende in vitro-Analyse ohne Metabolisierung der Substanzen war negativ. Die Autoren vermuteten, daß Metabolite der Substanzen, vor allem aber von CBZ, für die positiven Effekte

in vivo verantwortlich waren. KÜNIGSTEIN et al. (1984) untersuchten fünf Metabolite (Reinsubstanzen) an peripheren Lymphozyten in vitro auf chromosomale Aberrationen, sowie auf SCE-Häufigkeiten; die Ergebnisse waren durchweg negativ.

In einer Verlaufsanalyse wurde von OBE et al. (1980), neben neu in die Analyse aufgenommenen Probanden, ein Teil der 1976 bereits untersuchten Epileptiker erneut auf chromosomale Aberrationen überprüft. Die Aberrationen waren, mit Ausnahme der Ringchromosomen, bei den Patienten unter Mono- und Kombinationstherapie auf Kontrollniveau abgesunken. Die Autoren vermuten, daß nicht die Antiepileptika, sondern andere Faktoren für die erhöhte Aberrationsrate bei Epileptikern im Jahre 1976 verantwortlich waren.

Eine weitere mögliche Erklärung der erhöhten Aberrationsrate in den Lymphozyten der Epileptiker könnte eine comutagene Wirkung anderer chemischer Substanzen mit CBZ sein.

MADLE (1981,b) testete CBZ und fünf seiner Metabolite in Kombination mit Bleiacetat oder dem Pyrolyseprodukt Harman im SCE-Test an menschlichen Lymphozyten in vitro mit negativem Ergebnis.

Obwohl Epoxide potentielle Mutagene sind, scheint das gebildete CBZ-EP nicht mutagen zu sein. WADE et al. (1978, 1979) vermuten, daß die biologische Aktivität der Epoxide von der Stellung des Oxiranrings im Molekül und der Bindung an der chemischen Grundstruktur abhängig ist.

Im Salmonella/Mikrosomentest nach AMES et al. (1975) wurden mit den Teststämmen TA 1535, TA 1537 und TA 1538 für CBZ-EP und zwei weitere 10.11-substituierte Epoxide keine mutagenen Wirkungen gefunden (GLATT et al.1975).

In einer weiterführenden Studie testeten GLATT et al. (1983) im AMES-Test mit den Salmonella Teststämmen TA 98 und TA 100 Epoxide unterschiedlicher Struktur. Neben Arzneimitteln, Arzneimittel-Metaboliten, Steroiden und Pestiziden wurde auch das CBZ-EP getestet, welches wiederum keine mutagenen Effekte zeigte.

BRAUN et al. (1982) prüften neben Valepotriaten Epoxide auf ihre Alkylierungsfähigkeit. Als nucleophiles Agens wurde 4-(p-Nitrobenzyl)-pyridin gewählt, das unter physiologischen Bedingungen in wässrigem Medium mit Alkylantien zu einem blauen Farbstoff reagiert, der bei 560 nm spektrometrisch bestimmt werden kann. In diesem Test konnte für CBZ-EP keine alkylierende Aktivität nachgewiesen werden.

Die Befunde für CBZ mit den in der vorliegenden Arbeit verwendeten Testsystemen stimmen somit mit den Ergebnissen der Untersuchungen anderer Autoren überein.

ETHANOL

Ethanol wurde in dieser Arbeit als Lösungsmittel für CBZ verwendet.

Beim ersten Perfusionsversuch (rezirkulierendes Perfusionssystem) mit CBZ und Ethanol (Ethanolkonzentration im Perfusat = 3,5 %) war im Vergleich zur Kontrolle eine geringe SCE-Erhöhung zu beobachten (Tabelle 16; Versuch P-12). Dieser Effekt wurde mit dem offenen Perfusionssystem (gleicher Versuch P-12; Tabelle 7) nicht beobachtet. Durch Verdünnung des Perfusates bei der Zugabe zu den Kulturen betrug die Ethanolkonzentration 0,125 bis 1 Prozent.

Der erste Perfusionsversuch (rezirkulierendes Perfusionssystem) mit Ethanol alleine ergab ebenfalls eine leichte SCE-Erhöhung (Versuch P-3; Tabelle 13).

In vivo wird Ethanol zu der mutagenen Substanz Acetaldehyd metabolisiert. Es wäre somit möglich, daß Ethanol in den verwendeten Testsystemen zu Mutationen führen konnte.

Daher wurden zusätzliche Versuche mit Ethanol alleine und mit Disulfiram (Antabus) mit allen drei verwendeten Aktivierungssystemen durchgeführt.

Wie aus den Tabellen 13, 20 und 22 ersichtlich ist, zeigte Ethanol keine mutagene Wirkung.

Bei einem von drei Parallelversuchen der Rattenleberperfusion

mit Ethanol (Versuch P-3, rezirkulierendes System; Tabelle 13) stiegen die SCE-Raten mit der Behandlungszeit von 7,78 auf 9,20 SCE/Metaphase an. Im statistischen Test nach MANN und WHITNEY (SIEGEL, 1956; SACHS, 1968) sind die SCE-Werte der Kulturen ab 60 Minuten Behandlungszeit im Vergleich zur Kontrolle (7,36 SCE/Metaphase) signifikant erhöht ($\hat{Z} \geq 1,65$). Dieses Ergebnis konnte in den beiden anderen Versuchen nicht mehr reproduziert werden. Werden die Ergebnisse der drei Versuche gemittelt, ergibt sich kein signifikanter Effekt mehr (siehe Tabelle 13); das eine positive Ergebnis wird deshalb als Zufallsbefund gewertet.

Der Nachweis, daß Ethanol selbst nicht mutagen, jedoch über den Stoffwechsel zu einem mutagenen Metaboliten umgebaut wird, wurde durch Versuche von RIEGER und MICHAELIS (1960), OBE und RISTOW (1977), RISTOW und OBE (1978) und OBE et al. (1978) geführt. Demzufolge ist das erste Metabolisierungsprodukt des Ethanols, das Acetaldehyd, für die gefundenen Mutationen verantwortlich. Die von Acetaldehyd induzierten Crosslinks an isolierter DNS sind ein Effekt, der für alkylierende Substanzen charakteristisch ist (RISTOW und OBE, 1978; OBE und BEEK, 1979).

Für in vitro-Versuche mit Ethanol unter Einbeziehung metabolisierender Testsysteme sind in der Literatur unterschiedliche Ergebnisse beschrieben:

Im AMES-Test mit *Salmonella typhimurium* Stamm TA 98 war Ethanol mit S 9-Mix nicht mutagen (McCANN et al. 1975 a).

DeRAAT et al. (1983) testeten Ethanol unterschiedlicher Reinheitsgrade, sowie alkoholische Getränke und Acetaldehyd in mehreren Konzentrationen in CHO-Zellen mit und ohne S 9-Mix. Sie fanden für absolutes Ethanol mit S 9-Mix eine dosisabhängige Steigerung der SCE-Rate von 9,85 SCE/Metaphase (Kontrolle) auf 29,4 SCE/Metaphase bei einer Ethanolkonzentration von 3,16 Prozent. Selbst ohne Aktivierungssystem war die SCE-Rate fast verdoppelt (10,5 SCE/Metaphase in der Kontrolle zu 17,4 SCE/Metaphase bei 3,16 Prozent Ethanol). Dieser Befund konnte in einem Nachfolgeversuch jedoch nicht mehr bestätigt

werden.

Verschiedene alkoholische Getränke zeigten wie Ethanol nach metabolischer Aktivierung mit S 9-Mix eine deutliche SCE-Erhöhung. Bei der Prüfung von Port und Sherry lagen die SCE-Werte sogar noch höher als bei absolutem Ethanol (Port: 39,5 SCE/Metaphase; Sherry 43,0 SCE/Metaphase; Ethanol 35,5 SCE/Metaphase, Konzentration 1,58 % (v/v); Kontrolle 12,1 SCE/Metaphase). Die Autoren vermuten, daß in diesen beiden Getränken Komponenten enthalten sind, die zu einer Erhöhung der SCE-Raten führen.

Alkoholische Getränke enthalten außer Ethanol noch andere Substanzen, wie beispielsweise Methanol, höhere Alkohole, Aldehyde, Pyrolyseprodukte, Säuren, Ester, Tannine und Feststoffe, die bei der Herstellung entstehen und während der Lagerung aus den Fässern diffundieren (LEAKE und SILVERMAN, 1971). Die Rückstände verschiedener Spirituosen wurden im AMES-Test mit den Stämmen TA 98 und TA 100 und im SCE-Test an menschlichen Lymphozyten in vitro untersucht und ergaben überwiegend positive Befunde (LOQUET et al. 1981; NAGAO et al. 1981; HOEFT und OBE, 1983).

In der vorliegenden Arbeit konnten die von DeRAAT et al. (1983) an CHO-Zellen beschriebenen positiven Befunde an peripheren Lymphozyten nicht bestätigt werden.

ETHANOL und DISULFIRAM

Zur Anreicherung der Acetaldehyd-Konzentration wurde Ethanol mit Disulfiram (Antabus), das die Aktivität des Enzyms Aldehyddehydrogenase irreversibel hemmt, zusätzlich getestet.

Disulfiram allein ist offenbar nicht mutagen (LILLY, 1975).

Die SCE-Raten der mit Ethanol und Disulfiram behandelten Lymphozytenkulturen sind, wie aus den Tabellen 17, 20 und 23 ersichtlich, nicht erhöht.

In einem von drei Parallelversuchen der Rattenleberperfusion (P-16, rezirkulierendes System, Tabelle 17) stiegen die SCE-Werte mit der Behandlungszeit von 7,2 auf 11,64 SCE/Metaphase

an.

Im statistischen Test nach MANN und WHITNEY (SIEGEL, 1956; SACHS, 1968) sind die SCE-Werte der Lymphozytenkulturen aller Behandlungszeiten im Vergleich zur Kontrolle (4,93 SCE/Metaphase) signifikant erhöht ($\hat{z} \geq 1,65$). Dieses positive Ergebnis konnte in den beiden anderen Versuchen nicht mehr bestätigt werden. Waren alle Ergebnisse der drei Versuche gemittelt, ist kein Effekt mehr feststellbar (Tabelle 17); das eine positive Ergebnis wird deshalb als Zufallsbefund gewertet.

CYCLOPHOSPHAMID

Cyclophosphamid (CP) wurde als positive Referenzsubstanz verwendet und führte in allen Testsystemen zu einer Erhöhung der SCE-Rate.

Ohne metabolisierendes System (negative CP-Kontrolle) lagen die SCE-Raten im Kontrollbereich.

WAALKENS et al. (1981) und NORPPA et al. (1983) behandelten menschliche Lymphozyten mit CP (Konzentration: 10^{-4} M bis $2 \cdot 10^{-3}$ M) für 48 Stunden und fanden einen Anstieg der SCE-Raten von 10 SCE (Kontrollbereich) bis 25 SCE. Diesen Befund interpretieren die Autoren mit einer geringen Metabolisierungsfähigkeit der Lymphozyten für CP.

WINCKLER et al. (im Druck) testeten CP ohne Aktivierungssystem für 24 Stunden an menschlichen Lymphozyten (Konzentration: $1 \cdot 10^{-3}$ M bis $3,2 \cdot 10^{-3}$ M). Die SCE-Werte stiegen bis 30,7 SCE/Metaphase an. In wässriger Lösung kann CP spontan in genotoxische Produkte zerfallen (MAYER et al. 1976; GAT-HOUSE 1978). Bei langen Behandlungszeiten von 24 bis 48 Stunden könnten diese Produkte auf die Zellen einwirken und mit der DNS reagieren.

Eine kurze Behandlungszeit von ein bis drei Stunden mit CP ohne Aktivierung, wie hier in den Versuchen durchgeführt, ist

für die Bildung genotoxischer Produkte anscheinend nicht ausreichend. Diese Ergebnisse stimmen mit anderen Literaturdaten über diesen Behandlungszeitraum überein (ALLEN und LATT, 1976; WHITE und HESKETH, 1980; MADLE 1981 a; MADLE und OBE, 1981).

VERGLEICH DER TESTSYSTEME

Leberperfusion - Lebermikrosomen (S 9-Mix) - Schweineleber-homogenat

Konzentrationsvergleich

Die Perfusionen P-6 und P-7 (Offenes Perfusionssystem; Tabelle 8), die nach dem gleichen Versuchsplan, jedoch nur mit unterschiedlichen CP-Konzentrationen durchgeführt wurden, ergeben sehr große Schwankungen der SCE-Raten.

Vergleicht man die Konzentration $0,25 \cdot 10^{-3}$ M (Versuch P-6) und $0,286 \cdot 10^{-3}$ M (Versuch P-7), ist die SCE-Rate im Versuch P-6 verdoppelt (P-6: 45 SCE/Metaphase; P-7: 22,5 SCE/Metaphase). Ein Grund für diese Schwankungen könnten eine unterschiedliche Metabolisierungskapazität der verwendeten Versuchstiere sein. Der Perfusionsfluß war bei Versuch P-6 um 2 ml pro Minute höher als bei Versuch P-7, was möglicherweise eine bessere Sauerstoffversorgung der Leber bewirkte.

Bei Perfusion P-8 wurden nacheinander unterschiedliche CP-Konzentrationen perfundiert. Die SCE-Rate steigt mit der Konzentration kontinuierlich bis zu 40 SCE/Metaphase an (Tabelle 10). Der Effekt fällt im Vergleich zu Versuch P-6 geringer aus. Zusätzlich zu dem oben genannten Grund für die SCE-Schwankungen ist ein geringer Verdünnungseffekt durch die im Reservoir des Oxygenators befindliche niedriger konzentrierte Restflüssigkeit gegeben.

Unter Verwendung von S 9-Mix in den Lymphozytenkulturen steigerte CP in Konzentrationen von $1 \cdot 10^{-5}$ M bis $1 \cdot 10^{-4}$ M die SCE-Rate signifikant (Tabelle 20). Der Effekt ist bei zwei Blutspendern gleich stark.

Wie aus den Tabellen 18 bis 20 ersichtlich ist, führt CP unter

Verwendung von S 9-Mix bereits bei kürzerer Behandlungszeit und geringerer Konzentration zu einer stärkeren Erhöhung der SCE-Rate als perfundiertes CP.

Mögliche Gründe für die stärkeren Effekte von S 9-Mix gegenüber der Perfusion könnten darin liegen, daß der S 9-Mix von enzyminduzierten Rattenlebern stammte, während die Leberperfusion an unbehandelten Ratten vorgenommen wurde. Dadurch könnte eine qualitativ und quantitativ andere Enzymzusammensetzung vorhanden gewesen sein, die sich auf die Metabolisierung des CP auswirkte.

Wurde Homogenat von Schweineleber als Aktivierungssystem verwendet, ergab sich selbst bei einer sehr hohen CP-Konzentration von $1 \cdot 10^{-3}$ M nur eine Verdopplung der SCE-Rate. Die Schweineleber wurde ohne Vorreinigung homogenisiert und enthielt noch Blutreste, die eine Aktivität der Enzyme beeinträchtigen können (MARON und AMES, 1983).

Die im Versuchsverlauf zu beobachtende Eindickung des Homogenates und damit verbundene schwer abspülbare Ablagerungen an den Dialyseschläuchen könnten die Diffusion der genotoxischen Produkte behindert haben.

Der Homogenatanteil betrug im Versuch 50 Prozent. Gegenüber den Versuchen mit S 9-Mix (1 bis 2 Prozent in der Kultur) ist somit eine vergleichsweise viel höhere Proteinkonzentration eingesetzt worden. CP und seine Metabolite reagieren nicht nur mit der DNS, sondern auch mit Proteinen; das könnte zu einer Verminderung der genotoxischen Produkte von CP führen.

Positive Ergebnisse unter Verwendung von Leberhomogenaten Phenobarbital-behandelter Mäuse sind bei MADLE et al. (1978) beschrieben, wobei ausschließlich Chromosomenaberrationen ausgewertet wurden. In der nachfolgenden Tabelle sind diese Ergebnisse mit den anderen verwendeten Aktivierungssystemen aus den Arbeiten von MADLE et al. (1978) und MADLE und OBE (1977) zusammengestellt:

Tabelle 24: Einfluß verschiedener Aktivierungssysteme auf die SCE-Rate CP-induzierter Chromatidentranslokationen in menschlichen Lymphozyten.

Zusammenstellung der Ergebnisse aus den Arbeiten von MADLE und OBE (1977) und MADLE et al. (1978).

CP-Konzentration mM	Chromatidentranslokationen (RB') in 100 Metaphasen		
	Leber- Homogenat (Maus)	Leber- Perfusion (Ratte)	S 9-Mix (Maus)
2,86	-	16,2	-
1,43	15,7	9,8	-
1,00	-	-	+ 4,6 6,2
0,71	9,2	5,5	-
0,36	10,5	0,4	-
0,20	-	-	1,8
0,18	6,4	0,0	-
0,09	7,5	-	-
0,05	0,0	-	-

Behandlungszeit

Die Lymphozyten wurden beim rezirkulierenden Perfusionssystem (RPS; Seite 45) in der G₀-Phase des Zellzyklus unterschiedlich lange dem Perfusat mit 10⁻³ M CP ausgesetzt (Behandlungszeit: 15 - 60 Minuten).

Nur die Perfusionen P-7 und P-8 sind miteinander vergleichbar, da in diesen beiden Experimenten gleichhohe CP-Konzentrationen perfundiert wurden.

Die beiden Experimente (P-7 und P-8) zeigten starke Unterschiede in den SCE-Raten (Tabelle 14). Dies läßt, wie auch schon bei den Experimenten des offenen Perfusionssystems, auf eine mögliche unterschiedliche Metabolisierungskapazität der einzelnen Rattenlebern schließen.

Durch das rezirkulierende Perfusionssystem ist eine Akkumulation der Metabolite gewährleistet. Darüberhinaus können -bedingt durch die Tätigkeit der intakten Leberzellen- aktive Zwischenmetabolite zu möglichen anderen aktiven Metaboliten umgesetzt werden.

Im Versuch P-8 sind die SCE-Raten schon nach kurzen Behandlungszeiten relativ hoch im Vergleich zu Versuch P-7. Eine mögliche Erklärung für die höheren SCE-Raten im Versuch P-8 (im Vergleich zu P-7) könnten die unterschiedlichen Vorlaufzeiten vor der Dialyseschlauchzugabe sein. Zum Zeitpunkt der Dialyseschlauchzugabe können daher bereits unterschiedliche Konzentrationen der Metabolite vorgelegen haben.

Im Versuch mit Schweineleberhomogenat stiegen die SCE-Raten mit der Behandlungsdauer kaum an. Mögliche Gründe für diesen geringen SCE-Anstieg bei einer relativ hohen CP-Konzentration wurden auf Seite 103 diskutiert.

SCHLUSSBETRACHTUNG

Schweineleberhomogenat hat sich unter den hier verwendeten Versuchsbedingungen nicht zur Metabolisierung von CP in vitro bewährt. S 9-Mix aktivierte CP am effektivsten. Die im Vergleich dazu geringere Aktivierungsleistung der Leberperfusion kann folgende Gründe haben:

- 1) Die Lebern waren nicht enzyminduziert.
- 2) In der intakten Leberzelle finden giftende und entgiftende Reaktionen gleichzeitig statt.
Beim S 9-Mix finden vor allem die aktivierenden Reaktionen der Biotransformation (Phase I) statt; die entgiftenden Reaktionen der Phase II erfolgen nur noch in geringem Maße (FRANTZ und MALLING, 1975; GREEN et al. 1977; BROUNS et al. 1979; BIGGER et al. 1980).

Die Verwendung von S 9-Mix scheint für die Routineprüfung zur Erfassung potentieller Umweltnoxen am besten geeignet zu sein.

S 9-Mix ist routinemäßig einsetzbar und entsprechende Experimente sind schnell durchführbar.

Der Nachteil der Leberperfusion als Routinetest ist ihr großer apparativer Aufwand. Individuelle Unterschiede der einzelnen Tiere bezüglich der Metabolisierungskapazität können nicht ausgeschlossen werden.

Von Vorteil jedoch ist die Erfassung eines größeren Metabolisierungsspektrums durch den Einsatz eines weitgehend vollständigen Stoffwechsels; das System kommt somit der in vivo-Situation näher.

Es wird somit von der Fragestellung her entschieden werden müssen, welchem Aktivierungssystem der Vorzug gegeben wird.

ZUSAMMENFASSUNG

In dieser Arbeit wurden das Antiepileptikum CARBAMAZEPIN (CBZ), ETHANOL, ETHANOL und DISULFIRAM (Antabus) , sowie CYCLOPHOSPHAMID (CP) auf Schwesterchromatidenaustausche (SCE) an menschlichen peripheren Lymphozyten unter Ein-schluß folgender metabolisierender Testsysteme untersucht:

- 1) Rattenleberperfusion in situ
- 2) Lebermikrosomen (S 9-Mix)
- 3) Grobhomogenat aus Schweineleber.

CARBAMAZEPIN, ETHANOL, sowie ETHANOL und DISULFIRAM führten in keinem Fall zu einer Erhöhung der SCE-Rate.

Die Funktionsfähigkeit der verwendeten metabolisierenden Systeme wurde durch den Einsatz von CYCLOPHOSPHAMID nachgewiesen. CP erhöhte die SCE-Rate in allen Tests.

S 9-Mix war das wirksamste Aktivierungssystem.

Die Rattenleberperfusion war im Vergleich zu S 9-Mix weniger effektiv.

Homogenat aus Schweineleber ist als Aktivierungssystem nicht geeignet.

LITERATURVERZEICHNIS

- ABBONDANDOLO, A., S. BONATTI, G. CORTI, R. FIORI, N. LOPRIENO und A. MAZ-ZACARRO: Induction of 6-thioguanine-resistant mutants in V 79 Chinese hamster cells by mouse-liver microsome-activated dimethylnitrosamine
Mutat. Res. 46 (1977) 365-373
- ABE, T., T. IDE, M. TOSA, T. TAKAHASHI und T. TAKINO: Activation of Cyclophosphamide using perfused rat liver system and induction of sister chromatid exchanges in vitro
Hum. Genet. 58 (1981) 349
- ABE, S., N. NEMOTO und M. SASAKI: Sister chromatid exchange induction by indirect mutagens/carcinogens, aryl hydrocarbon hydrolase activity and benzo(a)pyrene metabolism in cultured human hepatoma cells
Mutat. Res. 109 (1983) 83-90
- AESCHBACHER, H.U. und C. CHAPPIUS: Non-mutagenicity of urine from coffee drinkers compared with that from cigarette smokers
Mutat. Res. 89 (1981) 161 - 177
- ALHADEFF, B. und M. COHEN: Frequency and distribution of sister chromatid exchanges in human peripheral lymphocytes
Isr. J. Med. Sci. 12 (1976) 1441-1447
- ALLEN, J.W. und A. LATT: In vivo BrdU-33258 Hoechst analysis of DNA replication kinetics and sister chromatid exchange formation in mouse somatic and meiotic cells
Chromosoma 58 (1976) 325
- ALVAREZ, M.R., L.E. CIMINO jr., M.J. CORY und R.E. GORDON: Ethanol induction of sister-chromatid exchanges in human cells in vitro
Cytogen. Cell. Genet. 27 (1980) 66 - 69
- AMES, B.N., W.E. DURSTON, E. YAMASAKI und F.D. LEE: Carcinogens are mutagens: A simple test system combining liver homogenates for activation and bacteria for detection
Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 70 (1973) 2281-2285
- AMES, B.N., McCANN, J. und E. YAMASAKI: Methods for detecting carcinogens and mutagens with the Salmonella/mammalian-microsome mutagenicity test
Mutat. Res. 31 (1975) 347-364
- ARNOLD, G. und H. BEKEL: Die Oxazolidon-Reaktion von 2-Chloräthyl-substituierten sekundären Aminen
Arzneim. Forsch. 14 (1964) 750 - 752
- ARRIGHI, F.E., T.C. HSU und D.E. BERGSAGEL: Chromosome damage in mouse and human cells after cytoxan therapy
Texas Rep. Biol. Med. 20 (1962) 545-549
- AUERBACH, C., M. MOUTSCHEN-DAHMEN und J. MOUTSCHEN: Genetic and cytogenetical effects of formaldehyde and related compounds
Mutat. Res. 39 (1977) 317-362
- AWA, A.A.: Cytogenetic and oncogenetic effects of the ionizing radiation of the atomic bombs
In: J.GERMAN (Ed.): Chromosomes and cancer, J.WILEY and Sons, New

- York, (1974) 637-674
- BADR, F.M. und R.S. BADR: Induction of dominant lethal mutations in male mice by ethyl alcohol
Nature 253 (1975) 134-136
- BADR, F.M., R.S. BADR, R.L. ASKER und F.H. HUSSAIN: Evaluation of the mutagenic effects of ethyl alcohol by different techniques
In: M.M. GROSS (Hrsg.): Intoxication and Alcohol withdrawal III a Biological aspects of ethanol. Advances in experimental Medicine and Biology 85 A (1977) 25-46
- BALBINDER, E., C. REICH, D. SHUGARTS, J. KEOGH, R. FIBIGER, T. JONES und A. BANKS: Relative mutagenicity of some urinary metabolites of the antitumor drug cyclophosphamide
Cancer Res. 41 (1981) 2967-2972
- BARTSCH, H. T. KUROKI, M. ROBERFROID und C. MALAVEILLE: Metabolic activation systems in vitro for carcinogen/mutagen screening tests
In: de SERRES F.J. und A. HOLLAENDER (Hrsg.): Chemical Mutagens, Principles and Methods for their Detection Vol. 7 (1982) 95-161 Plenum Press, New York, London
- BAUCHINGER, M. und E. SCHMID: Cytogenetische Veränderungen in weißen Blutzellen nach Cyclophosphamidtherapie
Z. Krebsforsch. 72 (1969) 77-87
- BEEK, B. und G. OBE: The human leukocyte test system VI: The use of sister chromatid exchanges as possible indicators for mutagenic activities
Humangenetik 29 (1975) 127-134
- BEEK, B., I. ARANDA und E. THOMSON: Induction of sister-chromatid exchanges, cell-cycle delay and chromosomal aberrations by human urine concentrates
Mutat. Res. 92 (1982) 333-360
- BEIJE, B., D. JENSSEN, E. ARRHENIUS und M.-A. ZETTERQUIST: Isolated liver perfusion - A tool in mutagenicity testing for the evaluation of carcinogens
Chem. Biol. Interact. 27 (1979) 41-57
- BEIJE, B., A. ÖNFELT und U. OLSSON: Influence of dietary selenium on the mutagenic activity of perfusate and bile from rat liver, perfused with 1,1-dimethylhydrazine
Mutat. Res. 130 (1984) 121-126
- BERTRAM, C. und G. HÖHNE: Über die radiomimetische Wirkung einiger Zytostatika im Mutationsversuch an Drosophila
Strahlentherapie 43 (1959) 388-391
- BIGGER, C.A., J.E. TOMASZEWSKI, A. DIPPLE und R.S. LAKE: Limitations of metabolic activation systems used with in vitro tests for carcinogens
Science 209 (1980) 503-505
- BIMBOES, D. und GREIM H.: Human lymphocytes as target cells in a metabolizing test system in vitro for detecting potential mutagens
Mutat. Res. 35 (1976) 155-160
- BIRD, R.P., H.H. DRAPER und P.K. BASRUR: Effect of malonaldehyde and acet-

- aldehyde on cultured mammalian cells. Production of micronuclei and chromosomal aberrations
Mutat. Res. 101 (1982) 237-246
- BRANDT, R.: Passage of diazepam and desmethyldiazepam into breast milk
Arzneim. Forsch. 26 (1976) 454-457
- BRAUN, R. und J. SCHÖNEICH: Zur Beeinflussung der mutagenen Wirksamkeit von Cyclophosphamid im Host-mediated Assay mit *Salmonella typhimurium* TA 1500 durch Probenecid
Biol. Zbl. 96 (1977) 151-159
- BRAUN, R., W. DITTMAR, M. MACHUT und S. WEICKMANN: Valepotriate mit Epoxidstruktur - beachtliche Alkylantien
Dtsch. Apotheker Ztg. 122 (1982) 1109-1113
- BREGMANN, A.A.: Cytogenetic effects of ethanol in human leukocyte cultures
Environm. Mutagen. 4 (1971) 35-36
- BRESLOW, R. und L.N. LUKENS: On the mechanism of action of an ascorbic acid-dependent nonenzymatic hydroxylating system
J. Biol. Chem. 235 (1960) 292-296
- BRITTINGER D.: The mutagenic effect of endoxan in the mouse
Humangenetik 3 (1966) 156-165
- BROCK, N. und H.-J. HOHORST: Über die Aktivierung von Cyclophosphamid im Warmblüterorganismus
Naturwissenschaften 49 (1962) 610-611
- BROCK, N. und H.-J. HOHORST: Über die Aktivierung von Cyclophosphamid in vivo und in vitro
Arzneim.-Forsch. (Drug Res.) 13 (1963) 1021-1031
- BROUNS, R.-E., R.P. BOS, P.J.L. vanGEMERT, E.W.M. YIH-van de HURK und P.Th. HENDERSON: Mutagenic effects of benzo(a)pyrene after metabolic activation by hepatic 9000 g supernatants or intact hepatocytes
Mutat. Res. 62 (1979) 19-26
- CARRANO, A.V., J.L. MINKLER, D.G. STETKA und D.H. MOORE: Variation in the baseline sister chromatid exchange frequency in human lymphocytes
Environm. Mutagen. 2 (1980) 325-337
- COLVIN, M., R.B. BRUNDRETT, M.-N. KAN, I. JARDINE und C. FENSELAU: Alkylating properties of phosphoramidate mustard
Cancer Res. 36 (1976) 1121-1126
- CONNOR, T.H., G. CANTELLI, P. SITRA und M.S. LEGATOR: Bile as source of mutagenic metabolites produced in vivo and detected by *Salmonella typhimurium*
Environm. Mutagen. 1 (1979) 623-633
- COX, P.J.: Cyclophosphamide cystitis-identification of acrolein as the causative agent
Biochem. Pharmac. 28 (1979) 2045-2049
- COX, P.J. und L. LEVIN: Novel metabolic products of cyclophosphamide in human urine
Biochem. Pharmac. 24 (1975) 1233-1235

- CUMMING, R.B. und M. T. WALTON: Genetic effects of cyclophosphamide in the germ cells of male mice
Genetics 68 (1971) s14 (abstract)
- DAM, M. und A. MOURITZEN DAM: Epilepsie, Schwangerschaft und Geburt
In DOOSE, H., M. DAM, G. GROß-SELBECK und H. MEINARDI (Hrsg.):
Epilepsie 1979, Georg Thieme-Verlag, Stuttgart, New York,
(1980) 1-16
- DEARFIELD, K.L., D. JACOBSON-KRAM, N.A. BROWN und J.R. WILLIAMS: Evaluation of a human cell line as a target cell in genetic toxicology
Mutat. Res. 108 (1983) 437-449
- DEGEN, L.: Die mutagene Wirkung einiger Radiomimetika auf den Colipha-gen T₂
Path. Microbiol. 26 (1963) 237-249
- DEKNUDT, G. und O. KAMRA: Influence of various mitogens on the yield of sister chromatid exchanges, induced by chemicals, in human lymphocytes
Mutat. Res. 111 (1983) 161-170
- DEWHURST, F.: The effect of age, sex, strain, species and dose level differences upon the metabolism of 2-naphtylamine in rodents
Br.J. Cancer 17 (1963 a) 365-370
- DEWHURST, F.: The effect of stress upon the metabolism of 2-naphtylamine in mice
Experientia 19 (1963 b) 646-664
- DIETRICH, E., A. LUKAS, A. STEVELING, N. SEYFENDINIPUR und J. SPRANGER: Art und Ausmaß von Fehlbildungen bzw. Fehlbildungsmustern bei Kindern antiepileptisch behandelter Väter und Mütter
In: DOOSE, H., M. DAM, G. GROß-SELBECK und H. MEINARDI (Hrsg.):
Epilepsie 1979, Georg Thieme-Verlag, Stuttgart-New York,
(1980) 47-53
- DOBOS, M., D. SCHULER und G.Y. FEKETE: Cyclophosphamide - induced chromosomal aberrations in nontumorous patients
Humangenetik 22 (1974) 221-227
- DRAKE, J.W., S. ABRAHAMSON, J.F. CROW, A. HOLLAENDER, S. LEDERBERG, M.S. LEGATOR, M.W. SHAW, H.E. SUTTON, R.C. von BORSTEL und S. ZIMMERING: Environmental mutagenic hazards
Science 187 (1975) 503-514
- DRUCKREY, H., D. STEINHOFF, M. NAKAJIMA, R. PREUSSMANN und K. ANGER: Experimentelle Beiträge zum Dosis-Problem in der Krebs-Chemotherapie und zur Wirkungsweise von Endoxan
Dtsch. Med. Wschr. 88 (1963) 651-663 und 715-721
- DÜKER, D.: Investigations into sister chromatid exchange in patients under cytostatic therapy
Hum. Genet. 58 (1981) 198-203
- van DUUREN, B.L., N. NELSON, L. ORRIS, E. PALMES und F.L. SCHMITT: Carcinogenicity of Epoxides, lactones, and peroxy compounds Part I
J. Nat. Cancer Inst. 31 (1963) 41-55
- van DUUREN, B.L., L. ORRIS und N. NELSON: Carcinogenicity of Epoxides, lactones and peroxy compounds Part II
J. Nat. Cancer Inst. 35 (1965) 707-717

- van DUUREN, B.L., L. LANGSETH, L. ORRIS, G. TEEBOR, N. NELSON und M. KUSCHNER: Carcinogenicity of epoxides, lactones, and peroxy compounds IV. Tumor response in epithelial and connective tissue in mice and rats
J. Nat. Cancer Inst. 37 (1966) 825-838
- EHRENBERG L. und Å. GUSTAFSSON: On the mutagenic action of ethylene oxide and di-epoxybutane in barley
Hereditas 43 (1957) 595-602
- EHRENBERG, L. und S. HUSSAIN: Genetic toxicity of some important epoxides
Mutat. Res. 86 (1981) 1-113
- EHRICH, M., J.E. ASWELL, R.L van TASSEL, T.D. WILKINS, A.R.P. WALKER und N.J. RICHARDSON: Mutagens in the feces of 3 south african populations at different levels of risk for colon cancer
Mutat. Res. 64 (1979) 231-240
- ELLENBERGER, J. und G.R. MOHN: Mutagenic activity of cyclophosphamide, ifosfamide, and trofosfamide in different genes of Escherichia coli and Salmonella typhimurium after biotransformation through extracts of rodent liver
Arch. Toxicol. 33 (1975) 225-240
- ELLENBERGER, J. und G.R. MOHN: Mutagenic activity of major mammalian metabolites of cyclophosphamide towards several genes of Escherichia coli
J. Toxicol. Environ. Health 3 (1977) 637-650
- ESSIGMANN, J.M., P.R. DONAHUE, D.L. STORY, WOGAN, G.N. und H. BRUNENGRABER: Use of the isolated perfused rat liver to study carcinogen-DNA adduct formation from Aflatoxin B₁ and Sterigmatocystin
Cancer Res. 40 (1980) 4085-4091
- EXTON, J.H.: The perfused rat liver
Methods in Enzymology 39 (1975) 25-36
- FAIGLE, J.W., S. BRECHBÜHLER, K.F. FELDMANN und J.W. RICHTER: Die Bio-transformation von Carbamazepin
In: BIRKMAYER, W. (Hrsg.): Anfall, Verhalten, Schmerz, Verlag Hans Huber, Bern, Stuttgart, Wien (1976) 130-142
- FALCK, K., M. SORSA und H. VAINIO: Mutagenicity in urine of workers in rubber industry
Mutat. Res. 79 (1980) 45-52
- FENSELAU, C., M.-N. KAN, S.S. RAO, A. MYLES, O.M. FRIEDMAN und M. COLVIN: Identification of aldophosphamide as a metabolite of cyclophosphamide in vitro and in vivo in humans
Cancer Res. 37 (1977) 2538-2543
- FOLEY, G.E., O.M. FRIEDMAN und B.P. DROLET: Studies on the mechanism of activation of cytoxan - Evidence of activation in vivo and in vitro
Cancer Res. 21 (1961) 57-63
- FORTH, W., D. HENSCHLER und RUMMEL W.: Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie
Bibl. Institut, Wissenschaftsverlag Mannheim, Wien, Zürich
3. Auflage, 1980
- FORTI, G.C. und N.M. TRIEFF: Kinetics of uptake and biliary excretion of Benzo(a)pyrene and mutagenic metabolites in isolated perfused liver
Teratogenesis, Cancerogenesis and Mutagenesis 1 (1980) 269-282

- FRANTZ, C.N. und H.V. MALLING: Factors affecting metabolism and mutagenicity of dimethylnitrosamine and diethylnitrosamine
Cancer Res. 35 (1975) 2307-2314
- FREUND, G.: Possible relationships of alcohol in membranes to cancer
Cancer Res. 39 (1979) 2899-2901
- GABRIDGE, M.G. und M.S. LEGATOR: A host-mediated assay for the detection of mutagenic compounds
Proc. Soc. Expl. Biol. 130 (1969) 831-834
- GABRIDGE, M.G., A. DENUNZIO und M.S. LEGATOR: Microbial mutagenicity in animal mediated assay
Nature 221 (1969) 68-70
- GAGNEUX, A.R.: Die Chemie von Carbamazepin
In: BIRKMAYER (Hrsg.): Anfall, Verhalten, Schmerz Verlag Hans Huber, Bern, Stuttgart, Wien (1976)
- GATEHOUSE, D.: Detection of mutagenic derivatives of Cyclophosphamide and a variety of other mutagens in a "microtitre" fluctuation test, without microsomal activation
Mutat. Res. 53 (1978) 289-296
- GEBHART, E.: Sister chromatid exchange (SCE) and structural chromosome aberration in mutagenicity testing
Hum. Genet. 58 (1981) 235-254
- GLATT, H.R., F. OESCH, A. FRIGERIO und S. GRATTINI: Epoxides metabolically produced from some known carcinogens and from some clinically used drugs. I. Differences in mutagenicity
Int. J. Cancer 16 (1975) 787-797
- GLATT, H.R., R. JUNG und F. OESCH: Bacterial mutagenicity investigation of epoxides: drugs, drug metabolites, steroids and pesticides
Mutat. Res. 111 (1983) 99-118
- GREEN, M.H.L., B.A. BRIDGES, A.A. ROGERS, G. HORSPOOL, W.J. MURIEL, J.W. BRIDGES und J.R. FRY: Mutagen screening by a simplified bacterial fluctuation test: Use of microsomal preparations and whole liver cells for metabolic activation
Mutat. Res. 48 (1977) 287-294
- GUERRERO, R.R., D.E. ROUNDS und T.C. HALL: Bioassay procedure for the detection of mutagenic metabolites in human urine with the use of sister chromatid exchange analysis.
J. Natl. Cancer Inst. 62 (1979) 805-809
- HALLEN, O.: Epilepsien im Erwachsenenalter
In: Die epileptischen Anfallskrankheiten Hrsg.: Bundesministerium für Jugend, Familie und Gesundheit von der Deutschen Sektion der Internationalen Liga gegen Epilepsie 1972, Heidelberger Verlagsanstalt 1972
- HAMPEL, K.E., M. FRITZSCHE und D. STOPIK: Quantitative Untersuchungen über Chromosomenmutationen bei menschlichen Leukozyten durch Cyclophosphamid nach Aktivierung an Leberschnitten
Humangenetik 7 (1969) 28-37

- HARRIS, C.C., J.C. HSU, G.D. STONER, B.F. TRUMP und J.K. SELKIRK:
Human pulmonary alveolar macrophages metabolize benzo(a)pyrene to proximate and ultimate mutagens
Nature 272 (1978) 633-634
- HARSANYI, Z., I.A. GRANEK und D.W.R. MACKENZIE: Genetic damage induced by ethyl alcohol in *Aspergillus nidulans*
Mutat. Res. 48 (1977) 51-73
- HEMS, R. B.D. ROSS, M.N. BERRY und H.A. KREBS: Gluconeogenesis in the perfused rat liver
Biochem. J. 101 (1966) 284-292
- HENSCHLER, D.: Wichtige Gifte und Vergiftungen
In: FORTH, W., D. HENSCHLER und W. RUMMEL (Hrsg.): Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie, Bibl. Instit. Wissenschaftsverlag, Mannheim, Wien, Zürich, 3. Auflage (1980) 572-642
- HERHA, J. und G. OBE: Chromosomal damage in chronic users of cannabis. In vivo investigation with two-day leukocyte cultures
Pharmacopsychiat. 7 (1974) 328-337
- HERHA, J. und G. OBE: Chromosomal damage in epileptics on monotherapy with Carbamazepin und Diphenylhydantoin
Hum. Genet. 34 (1976) 255-263
- HERHA J. und G. OBE: Chromosomal damage in patients with epilepsy: Possible mutagenic properties of long-term antiepileptic drug treatment
Epilepsy, The Eighth International Symposium, PENRY (Ed.), Raven Press, New York (1977) 87-94
- HOEFT, H. und G. OBE: SCE-inducing congeners in alcohol beverages
Mutat. Res. 121 (1983) 247-251
- HÖGSTEDT, C., N. MALQUIST und D. WADMAN: Leukemia in workers exposed to ethylene oxide
J. Am. Med. Assoc. 241 (1979) 1132-1133
- HOPKIN, J.M. und H.J. EVANS: Cigarette smoke induced DNA damage and lung cancer risks
Nature 283 (1980) 388-390
- HSU, J.C., G.D. STONER, H. ANTRUP, B.F. TRUMP, J.K. SELKIRK und C.C. HARRIS: Human bronchus-mediated mutagenesis of mammalian cells by carcinogenic polynuclear aromatic hydrocarbons
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 75 (1978) 2003-2007
- HUBERMAN, E. und L. SACHS: Cell mediated mutagenesis of mammalian cells with chemical carcinogens
Int. J. Cancer 13 (1974) 326-333
- INUI, N. und Y. NISHI: A short-term test to detect organotropic specificity of carcinogens
Toxicol. Lett. 2 (1978) 277-283
- JANZ, D.: DFG Denkschrift - Epilepsie
Harald Boldt Verlag, Boppard, 1975
- JANZ, D.: Über das Risiko von Mißbildungen und Anomalien bei Kindern von Eltern mit Epilepsie
In H. DOOSE, M. DAM, G. GROß-SELBECK und H. MEINARDI (Hrsg.): *Epilepsie* 1979, Georg Thieme-Verlag, Stuttgart, New York, 1980, 28-39

- JARDINE, I., C. FENSELAU, M. APPLER, M.-N. KAN, R.B. BRUNDRETT und M. COLVIN: Quantitation by gaschromatography-chemical ionization mass spectrometry of cyclophosphamide, phosphoramid mustard, and nitrogen mustard in the plasma and urine of patients receiving cyclophosphamide therapy
Cancer Res. 38 (1978) 408-415
- JERINA, D.M. und J.W. DALY: Arene oxides: A new aspect of drug metabolism
Science 185 (1974) 573-581
- JONES, C.A. und E. HUBERMAN: A sensitive hepatocyte-mediated assay for the metabolism of nitrosamines to mutagens for mammalian cells
Cancer Res. 40 (1980) 406-411
- JURNA, J.: Antiepileptika: Pharmakotherapie der Epilepsie
In FORTH, W., D. HENSCHLER und W. RUMMEL (Hrsg.) Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie, B.I. Wissenschaftsverlag, Mannheim, Wien, Zürich, 3. Auflage (1980) 411-417
- KLIGERMAN, A.D., S.C. STROM und G. MICHALOPOULOS: Sister-chromatid exchange studies in human fibroblast-rat hepatocyte co-culture: a new in vitro system to study SCEs
Environ. Mutagen. 2 (1980) 157-165
- KLINE, S.A., E.C. MCCOY, H.S. ROSENKRANZ und B.L. van DUUREN: Mutagenicity of chloroalkene epoxides in bacterial systems
Mutat. Res. 101 (1982) 115-125
- KLINGER, W.: Biotransformation in der Leber
In: ANKERMAN H. (Hrsg.) Entwicklungspharmakologie, VEB-Verlag Volk und Gesundheit (1973) 52-105
- KUNIGSTEIN, M., M. LARISCH und G. OBE: Mutagenicity of antiepileptic drugs I. Carbamazepine and some of its metabolites
Mutat. Res. 139 (1984) 83-86
- KORSTEN, M.A., MATSUZAKI, L. FEINMANN und C.S. LIEBER: High blood levels after ethanol administration. Difference between alcoholic and non-alcoholic subjects
N. Engl. J. Med. 292 (1975) 386-389
- KORTE, A., G. OBE, J. INGWERSEN und G. RÜCKERT: Influence of chronic ethanol uptake and acute acetaldehyde treatment on the chromosomes of bone-marrow cells and peripheral lymphocytes of Chinese hamsters
Mutat. Res. 88 (1981) 389-395
- KRAHN, D.F. und C. HEIDELBERGER: Liver homogenate-mediated mutagenesis in Chinese hamster V 79 cells by polycyclic aromatic hydrocarbons and aflatoxins
Mutat. Res. 46 (1977) 27-44
- KRIEBEL, D., B. COMMONER, D. BOLLINGER, BRONSDON, J. GOLD und J. HENRY: Detection of occupational exposure to genotoxic agents with a urinary mutagen assay
Mutat. Res. 108 (1983) 67-79
- KUHNLEIN, U., D. BERGSTROM und H. KUHNLEIN: Mutagens in feces from vegetarians and non-vegetarians
Mutat. Res. 85 (1981) 1-12

- KUROKI, T., C. DREVON und R. MONTESANO: Microsome-mediated mutagenesis in V 79 Chinese hamster cells by various nitrosamines
Cancer Res. 37 (1977) 1044-1050
- LATT, S.A.: Sister chromatid exchanges, Indices of human chromosome damage and repair: Detection by fluorescence and induction by Mitomycin C
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 71 (1974) 3162-3166
- LEAKE, C.D. und M. SILVERMAN: The chemistry of alcoholic beverages
In: KISSIN B. und H. BEGLEITER (Eds.) Biochemistry, The biology of alcoholism Vol 1 (1971) 575-612, Plenum Press, New York
- LEGATOR, M.S., L. TRUONG, und T.H. CONNOR: Analysis of body fluids including alkylation of macromolecules for detection of mutagenic agents
In: HOLLAENDER, A. und F.J. deSERRES (Eds.) Chemical Mutagens: Principles and Methods for their detection, Plenum Press, New York, (1978) 1-23
- LIEBER, S.: The metabolism of alcohol
Scientific American 243 (1976) 25-33
- LILLY, L.J.: Investigations in vitro and in vivo, of the effects of disulfiram (antabus) on human lymphocyte chromosomes
Toxicology 4 (1975) 331-340
- LOQUET, C., G. TOUSSAINT und J. Y. LeTALAER: Studies on mutagenic constituents of apple brandy and various alcoholic beverages collected in western france, a high incidence area for oesophageal cancer
Mutat. Res. 81 (1981) 155-164
- MADLE, E.: Untersuchungen zur mutagenen Wirkung von Carbamazepin an menschlichen Lymphozytenkulturen: Kombinationsexperimente mit Bleiacetat und β -Carbolen
Diplomarbeit, Freie Universität Berlin, 1981 b
- MADLE, S.: Der Test indirekter Mutagene in menschlichen Leukozytenkulturen in vitro
Dissertation, Freie Universität Berlin, 1979
- MADLE, S.: Evaluation of experimental parameters in an S 9/human leukocyte SCE test with Cyclophosphamide
Mutat. Res. 85 (1981) 347-356
- MADLE, S. und G. OBE: In vitro testing of an indirect mutagen (Cyclophosphamide) with human leukocyte cultures: Activation with liver microsomes and use of a dialysis bag
Mutat. Res. 56 (1977) 101-104
- MADLE, S. und G. OBE: In vitro testing of an indirect mutagen (Cyclophosphamide) with human leukocyte cultures. Activation by a non-enzymatic hydroxylation system (Udenfriend system)
Mutat. Res. 49 (1978) 149-151
- MADLE, S. und G. OBE: Methods for analysis of the mutagenicity of indirect mutagens/carcinogens in eukaryotic cells
Hum. Genet. 56 (1980) 7-20
- MADLE, S. und G. OBE: The use of rat liver perfusion to detect indirect mutagens/carcinogens in human leukocytes in vitro
Arzneim. Forschg. (Drug Res.) 31 (1981) 822-824

- MADLE, S., D. WESTPHAL, V. HILBIG und G. OBE: Testing in vitro of an indirect mutagen (Cyclophosphamide) with human leukocyte cultures
Activation by liver perfusion and by incubation with crude liver homogenate
Mutat. Res. 54 (1978) 95-99
- MAGUIRE, M.P.: Ethanol-induced abnormal meiotic chromosomal behavior in maize
Genetics 80 Supplement S54 (1975)
- MAJEWSKI, F.: Zur Teratogenität von Hydantoinen und Barbituraten
In: DOOSE, H., M. DAM, G. GROB-SELBECK und H. MEINARDI (Hrsg.): Epilepsie 1979, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York, 1980 54-57
- MALLING, H. V.: Mutagenicity of two potent carcinogens, dimethylnitrosamine, in *Neurospora crassa*
Mutat. Res. 3 (1966) 537-540
- MANNA, G.K. und S.C. MAZUMDER: Ethyl alcohol induced sex chromosome breakage in the grasshopper, *Phloeoba antennata*
Naturwissenschaften 51 (1964) 646
- MARON, D.M. und B.N. AMES: Revised methodes for the Salmonella mutagenicity test
Mutat. Res. 112 (1983) 173-215
- MARQUARDT, H. und D. SIEBERT: Ein neuer host-mediated assay (Urinversuch) zum Nachweis mutagener Stoffe mit *Saccharomyces cerevisiae*
Naturwissenschaften 58 (1971) 568
- MATTHES, A.: Epilepsie
Georg Thieme Verlag, Stuttgart 1977
- MAYER, V.W.: Mutagenicity of dimethylnitrosamine and diethylnitrosamine for *Saccharomyces* in an in vitro hydroxylation system
Mol. Gen. Genet. 112 (1971) 289-294
- MAYER, V.W.: Mutagenic effects induced in *Saccharomyces cerevisiae* by breakdown products of 1-naphtylamine and 2-naphtylamine formed in an enzyme-free hydroxylation system
Mutat. Res. 15 (1972) 147-153
- MAYER, V.W.: Induction of mitotic crossing over in *Saccharomyces cerevisiae* by breakdown products of dimethylnitrosamine, diethylnitrosamine, 1-naphtylamine and 2-naphtylamine formed by an in vitro hydroxylation system
Genetics 74 (1973) 433-442
- MAYER, V.W., C.J. HYBNER und D.J. BRUSICK: Genetic effects induced in *Saccharomyces cerevisiae* by Cyclophosphamide in vitro without liver enzyme preparations
Mutat. Res. 37 (1976) 201-212
- MEISNER, L.F. und S. INHORN: Chemically induced chromosome change in human cells in vitro
Acta Cytol. 16 (1972) 41-47
- MEISNER, L.F., S.L. INHORN und P.M. NIELSON: Chemically induced chromatid breaks: Toxicogenic or mutagenic
Mamm. Chromosomes Newsl. 11 (1970) 69-70
- MELZER, M.S.: Effect of carcinogens and other compounds on deoxyribonuclease
Biochem. Biophys. Acta 138 (1967) 613-616

- McCANN, J. und B.N. AMES: Detection of carcinogens as mutagens in the Salmonella/microsome test: Assay of 300 chemicals: Discussion Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 73 (1976) 950-954
- McCANN, J., E. CHOI, E. YAMASAKI und B.N. AMES: Detection of carcinogens as mutagens in the Salmonella/microsome test: Assay of 300 chemicals Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 72 (1975a) 5135-5139
- McCANN, J., V. SIMMON, D. STREITWIESER und B.N. AMES: Mutagenicity of chloroacetaldehyde, a possible metabolic product of 1,2-dichloroethane (ethylene dichloride) chloroethanol (ethylene chlorohydrin), vinyl chloride, and cyclophosphamide Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. (1975b) 3190-3193
- MICHAELIS, A. und R. RIEGER: Die Induktion von Chromosomenaberrationen durch Mitomycin und Endoxan bei *Vicia faba* und der Transportform-Wirkform-Mechanismus Biol. Zbl. 80 (1961) 301-317
- MICHALOPOULOS, G., G. SATTLER, L. O'CONNOR und H.C. PITOT: Unscheduled DNA-synthesis induced by procarcinogens in suspensions and primary cultures of hepatocytes on collagen membranes Cancer Res. 38 (1978) 1866-1871
- MILLER, L.L., C.G. BLY, M.L. WATSON und W.F. BALE: The dominant role of the liver in plasma protein. A direct study of the isolated perfused rat liver with the acid of lysine-C¹⁴ J. Exp. Med. 94 (1951) 431-453
- MORGAN, W.F. und P.E. CROSSEN: The incidence of sister chromatid exchanges in cultured human lymphocytes Mutat. Res. 42 (1977) 305-312
- MORTIMORE, G.E.: Effect of insuline on potassium transfer in isolated rat liver Amer. J. Physiol. 200 (1961) 1315-1319
- MÜLLER, D. A.T. NATARAJAN, G. OBE und G. RÖHRBORN (Hrsg.): Sister-chromatid exchange-test Workshop "Gesellschaft für Umweltmutationsforschung" (GUM), Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York 1982
- MUSILOVA, J., K. MICHALOVA und J. URBAN: Sister chromatid exchanges and chromosomal breakage in patients treated with cytostatics Mutat. Res. 67 (1979) 289-294
- MUTSCHLER, E.: Arzneimittelwirkungen Wiss. Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart, 3. Auflage 1975
- NAGAO, M., Y. TAKAHASHI, K. WAKABAYASHI und T. SUGIMURA: Mutagenicity of alcoholic beverages Mutat. Res. 88 (1981) 147-154
- NATARAJAN, A.T.: Relationship between sister-chromatid exchanges and chromosomal aberrations In: MÜLLER, D., A.T. NATARAJAN, G. OBE und G. RÖHRBORN (Hrsg.): Sister-chromatid exchange-test, Workshop "Gesellschaft für Umweltmutationsforschung" (GUM), Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York, 1982
- NATARAJAN, A.T., A.D. TATES, P.P.W. vanBUUL, M. MEIJERS und N. deVOGEL: Cytogenetic effects of mutagens/carcinogens after activation in a microsomal system in vitro. I. Induction of chromosome aberrations

- and sister chromatid exchanges by diethylnitrosamine (DEN) and dimethylnitrosamine (DMN) in CHO cells in the presence of rat-liver microsomes
 Mutat. Res. 37 (1976) 83-90
- NEMOTO, N., T. HIRAKAWA und S. TAKAYAMA: Glucuronidation of benzo(a)-pyrene in hamster embryo cells
 Chem.-Biol. Interact. 22 (1978) 1-14
- NORPPA, H., H. VAINIO und M. SORSA: Metabolic activation of styrene by erythrocytes detected as increased sister chromatid exchanges in cultured human lymphocytes
 Cancer Res. 43 (1983) 3579-3582
- OBE, G.: Mutagenicity of alcohol and tobacco smoke
 In: Y. ISRAEL, F.B. GLASER, H. KALANT, R.E. POPHAM, W. SCHMIDT und R.G. SMART (Eds.): Research Advances in Alcohol and Drug Problems Vol. 6 (1981) 281-318, Plenum Press, New York, London
- OBE, G., B. BEEK und G. DUDIN: The human leukocyte test system. V. DNA-synthesis and mitoses in PHA-stimulated 3-day cultures
 Humangenetik 28 (1975) 295-302
- OBE, G. und J. HERHA: Chromosomal damage in chronic alcohol users
 Humangenetik 29 (1975) 191-200
- OBE, G. und H.-J. RISTOW: Acetaldehyd but not ethanol induces sister chromatid exchanges in Chinese hamster cells in vitro
 Mutat. Res. 56 (1977) 211-213
- OBE, G., H.-J. RISTOW und J. HERHA: Mutagenic activity of alcohol in man
 Conference on mutations, their origin, nature and potential relevance to genetic risk in man. Jahreskonferenz der DFG, Zentral-laboratorium für Mutagenitätsprüfung (1977) 151-161
- OBE, G. und J. HERHA: Chromosomal aberrations in heavy smokers
 Hum. Genet. 41 (1978) 259-263
- OBE, G. und B. BEEK: Mutagenic activity of aldehydes
 Drug and Alcohol Dependence 4 (1979) 91-94
- OBE, G. und H.-J. RISTOW: Mutagenic, cancerogenic and teratogenic effects of alcohol
 Mutat. Res. 65 (1979) 229-259
- OBE, G., H.-J. RISTOW und J. HERHA: The effect of alcohol on chromosomal structure and function
 In: MAJCHROWICZ, E. und E.P. NOBLE (Eds): Biochemistry and Pharmacology of Ethanol, Vol. 1 (1979a) 659-676, Plenum Press, New York
- OBE, G., A.T. NATARAJAN, N. MEYERS und A. DenHertog: Induction of chromosomal aberrations in peripheral lymphocytes of human blood in vitro, and of SCEs in bone-marrow cells of mice in vivo by ethanol and its metabolite acetaldehyde
 Mutat. Res. 68 (1979b) 291-294
- OBE, G., D. GÜBEL, H. ENGELN, H. HERHA und A.T. NATARAJAN: Chromosomal aberrations in peripheral lymphocytes of alcoholics
 Mutat. Res. 73 (1980) 377-386
- OBE, G. und A.T. NATARAJAN: Umweltbedingte Mutationen beim Menschen
 Klinikarzt 9 (1980) 271-289
- OBE, G., L. RIEDEL und J. HERHA: Mutagenität von Antiepileptika

- In: DOOSE, H., M. DAM, G. GROß-SELBECK und H. MEINARDI (Hrsg.) :
Epilepsie 1979, Georg Thieme-Verlag, Stuttgart, New York
(1980) 58-69
- OBE, G. und S. MADLE: Prüfung der Mutagenität von Medikamenten beim Menschen
Prax. Pneumol. 35 (1981) 1027-1033
- OBE, G. und B. BEEK: The human leukocyte test system
In: deSERRES, F.J. und A. HOLLAENDER (Eds.): Chemical Mutagens
Principles and Methods for their Detection Vol. 7 (1982)
337-400, Plenum Press, New York, London
- OBE, G. und A.T. NATARAJAN: Mechanisms of the origin of structural chromosomal aberrations
In: MÜLLER, D., A.T. NATARAJAN, G. OBE und G. RÖHRBORN (Eds.): Sister-chromatid exchange-test, Workshop "Gesellschaft für Umweltmutationsforschung" (GUM), 1980, Georg Thieme-Verlag, Stuttgart, New York, (1982) 1-5
- OBE, G., S. KALWEIT, C. NOWAK und F.A. OSMAN: Liquid holding experiments with human peripheral lymphocytes. 1. Effects of liquid holding on sister chromatid exchanges induced by Trenimon, Diepoxybutane, Bleomycin and X-rays
Biol. Zbl. 101 (1982) 97-113
- OESCH, F.: Purification and specificity of a human microsomal epoxide hydratase
Biochem. J. 139 (1974) 77-88
- OESCH, F.: Metabolic transformation of clinically used drugs to epoxides New perspectives in drug-drug interactions
Biochem. Pharmacol. 25 (1976) 1935-1937
- OESCH, F., D. RAPHAEL, H. SCHWIND und H.R. GLATT: Species differences in activating and inactivating enzymes related to the control of mutagenic metabolites
Arch. Toxicol. 39 (1977) 97-108
- PARKE, D.V.: The biochemistry of foreign compounds
Pergamon Press, Oxford, New York, Toronto, Sydney, (1974)
- PAULSON, R.B., G.W. PAULSON und S. JREISSATY: Phenytoin and Carbamazepine in production of cleft palates in mice
Arch. Neurol. 36 (1979) 832-836
- PERRY, P. und S. WOLFF: New giemsa method for the differential staining of sister chromatids
Nature 251 (1974) 156-158
- PERRY, P. und H. J. EVANS: Cytological detection of mutagen-carcinogen exposure by sister-chromatid exchange
Nature 258 (1975) 121-125
- PERRY, P., E.J. THOMSON, VIJAYALAXMI, H.J. EVANS, N.E. DAY und H. BARTSCH: Induction of SCE by opium pyrolysates in CHO cells and human peripheral blood lymphocytes
Carcinogenesis 4 (1983) 227-230
- PKEIFER, S. und H.-H. BORCHERT: Arzneimittel und Organismus - Einführung in Pharmakokinetik und Biotransformation
Pharmazie 33 (1978) 128-174

- PUEYO, C., D. FREZZA und B. SMITH: Evaluation of three metabolic activation systems by a forward mutation assay in *Salmonella*
Mutat. Res. 64 (1979) 183-194
- de RAAT, W.K., P.B. DAVIS und G.L. BAKKER: Induction of sister-chromatid exchanges by alcohol and alcohol beverages after metabolic activation by rat-liver homogenate
Mutat. Res. 124 (1983) 85-90
- RANE, A., L. BERTILSSON und L. PALMER: Disposition of placentally transferred carbamazepin (Tegretol®) in the newborn
Europ. J. Clin Pharmacol. 8 (1975) 283
- RANNUG, U. und B. BEIJE: The mutagenic effect of 1,2-dichloroethane on *Salmonella typhimurium* II. Activation by the isolated perfused rat liver
Chem. Biol. Interaction 24 (1979) 265-285
- RAPOPORT, I. A.: Mutations under the influence of unsaturated aldehydes
Dokl. Akad. Nauk (S.S.S.R.) 61 (1948) 713-715
zitiert nach AUERBACH C., M. MOUTSCHEN-DAHMEN und J. MOUTSCHEN
Genetic and cytogenetical effects of formaldehyde and related compounds
Mutat. Res. 39 (1977) 317-362
- RAPOSA, T: Sister chromatid exchange studies for monitoring DNA damage and repair capacity after cytostatics in vitro and in lymphocytes of leukaemic patients under cytostatic therapy
Mutat. Res. 57 (1978) 241-251
- REDDY, B.S., C. SHARMA, L. DARBY, K. LAASKO und E.L. WYNDER: Fecal mutagens in high- and low-risk population for colon cancer
Mutat. Res. 72 (1980) 511-522
- RIEGER, R. und A. MICHAELIS: Chromosomenaberrationen nach Einwirkung von Acetaldehyd auf Primärwurzeln von *Vicia faba*
Biol. Zbl. 79 (1960a) 1-5
- RIEGER, R., und A. MICHAELIS: Einfluß von Stoffwechsellinhibitoren auf die radiomimetische Wirkung von Äthylalkohol
Monatsber. deut. Akad. Wiss. 2 (1960b) 290-297
- RIEGER, R. und MICHAELIS, A.: Beziehungen zwischen den Wurzelwachstum und der Sensibilität der Wurzelmeristeme gegenüber verschiedenen Radiomimetika bei *Vicia faba*
Chromosoma 11 (1961a) 573-581
- RIEGER, R. und A. MICHAELIS: Die Bedeutung von ATP für die radiomimetische Wirkung von Äthylalkohol bei *Vicia faba*
Naturwissenschaften 48 (1961b) 139
- RIEGER, R. und A. MICHAELIS: Intrachromosomal clustering of chromatid aberrations induced by maleic hydrazide and ethyl alcohol: Studies with an new karyotype of *Vicia faba*
Mutat. Res. 10 (1970) 162-164
- RIEGER, R. und A. MICHAELIS: Effects of chromosome repatterning in *Vicia faba* L.I. Aberrations, distribution, aberration spectrum, and karyotype sensitivity after treatment with ethanol of differently reconstructed chromosome complements
Biol. Zbl. 91 (1972) 151-169
- RIEGER, R., A. MICHAELIS, I. SCHUBERT, P. DÜBEL und H.-W. JANK: Non random intrachromosomal distribution of chromatid aberrations induced by X-rays, alkylating agents and ethanol in *Vicia faba*
Mutat. Res. 27 (1975) 69-79

- RISTOW, H.-J. und G. OBE: Acetaldehyde induces crosslinks in DNA and causes sister-chromatid exchanges in human cells
Mutat. Res. 58 (1978) 115-119
- RÜHRBORN, G.: Chemische Konstitution und mutagene Wirkung. IV. Zyklische N-Lost-Derivate
Mol. Gen. Genet. 102 (1968) 50-68
- ROSS, W.C.J.: Biological Alkylating Agents
Butterworth, London 1962
- ROSSI, A.M., L. MIGLIORE, N. LOPRIENO, M. ROMANO und M. SALMONA: Evaluation of epichlorohydrin (ECH) genotoxicity. Microsomal epoxide hydroxylase-dependent deactivation of ECH mutagenicity in *Schizosaccharomyces pombe* in vitro
Mutat. Res. 109 (1983) 41-52
- SACHS, L.: Statistische Auswertungsmethoden
Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York 1968
- SAX, K. und H.J. SAX: Radiomimetic beverages, drugs and mutagens
Pro. Natl. Acad. Sci. (Wash.) 55 (1966) 1431-1435
- SIEBERT, D.: A new method for testing genetically active metabolites. Urinary assay with cyclophosphamide (Endoxan, Cytoxan) and *Saccharomyces cerevisiae*
Mutat. Res. 17 (1973) 307-314
- SIEGEL, S.: Nonparametric statistics for the behavioral science
Int. Stud. Edition, Mc Graw-Hill, Kogakusha, Ltd. 1956
- SLADEK, N.E.: Metabolism of cyclophosphamide by rat hepatic microsomes
Cancer Res. 31 (1971) 901-908
- SOLOMON, E. und M. BOBROW: Sister chromatid exchanges - A sensitive assay of agents damaging human chromosomes
Mutat. Res. 30 (1975) 273-278
- SRAM, R.J., Z. ZUDOVA und N.P. KULESHOV: Cytogenetic analysis of peripheral lymphocytes in workers occupationally exposed to epichlorohydrin
Mutat. Res. 70 (1980) 115-120
- SULLING, W.J., R.F. STRUCK, C.W. WOOLEY und W.M. SHANNON: Comparative disposition of phosphoramidate and other cyclophosphamide metabolites in the mouse using the *Salmonella* mutagenesis assay
Cancer Treat. Rep. 62 (1978) 1321-1328
- SCHIMASSEK, H.: Metabolite des Kohlenstoffwechsels der isoliert perfundierten Rattenleber
Biochem. Z. 336 (1963) 460-467
- SCHMID, E. und M. BAUCHINGER: Inter und intrachromosomale Verteilung von Cyclophosphamid-induzierten Chromosomendefekten beim Menschen
Mutat. Res. 9 (1970) 417-424
- SCHMIDT, R.F.: Biomaschine Mensch
R. Piper + Co - Verlag, München, Zürich 1979
- SCHUBERT, I., S.STURELID, P. DÜBEL und R. RIEGER: Intra-chromosomal distribution patterns of mutagen-induced SCEs and chromatid aberrations in reconstructed karyotypes of *Vicia faba*
Mutat. Res. 59 (1979) 27-38
- STETKA, D.S. und S. WOLFF: Sister chromatid exchange as an assay for genetic damage induced by mutagen-carcinogens. I. In vivo test for

- compounds requiring metabolic activation
Mutat. Res. 41 (1976) 333-342
- STILLER, A., G. OBE, L. RIEDEL, H. RIEHM und C. KAPPES: Mutagens in human urine: Test with human peripheral lymphocytes
Mutat. Res. 97 (1982) 437-447
- STRUCK, R.F., M.C. KIRK, L.B. MELLET, S. EI DAREER und D.L. HILL: Urinary metabolites on the antitumor agent cyclophosphamide
Mol. Pharmacol. 7 (1971) 519-529
- TAKEHISHA, S. und S. WOLFF: The induction of sister-chromatid exchanges in Chinese hamster ovary cells by prolonged exposure to 2 acetyl-amino-fluorene and S 9-mix
Mutat. Res. 58 (1978) 103-106
- TATES, A.D., N. de VOGEL, und I. NEUTEBOOM: Cytogenetic effects in hepatocytes, bone marrow cells and blood lymphocytes of rats exposed to ethanol in the drinking water
Mutat. Res. 79 (1980) 285-288
- TONG, C., S. Ved BRAT und G.M. WILLIAMS: Sister chromatid exchange induction by polycyclic aromatic hydrocarbons in an intact cell system of adult rat-liver epithelial cells
Mutat. Res. 91 (1981) 467-473
- TOTTMAR, O. und H. MARCHNER: Characteristics of the acetaldehyde oxidation in rat liver, and the effects of antabuse, 4-methyl-pyrazole and unknown dietary factors on the hepatic output of acetaldehyde
In: LINDROS; K.O. und C.J.P. ERIKSSON: The role of acetaldehyde in the Actions of ethanol
Satell. Symp. 6th Int. Congr. Pharmac. Helsinki; The Finnish Foundation for Alcohol Studies 23 (1975) 47-66
- TOTTMAR, O. und H. MARCHNER: Disulfiram as a tool in the studies on the metabolism of acetaldehyde in rats
Acta Pharmacol. et Toxicol. 38 (1976) 366-375
- UDENFRIEND, S., C.T. CLARK, J. AXELROD und B.B. BRODIE: Ascorbic acid in aromatic hydroxylation. I. A model system for aromatic hydroxylation
J. Biol. Chem. 208 (1954) 731-739
- UMEDA, M. und M. SAITO: Mutagenicity of dimethylnirtosamine to mammalian cells as determined by the use of mouse liver microsomes
Mutat. Res. 30 (1975) 249-254
- VOGEL, E.: Mutagenic activity of cyclophosphamide, trofosamide and ifosamide in *Drosophila melanogaster*. Specific induction of recessive lethals in the absence of detectable chromosome breakage
Mutat. Res. 33 (1975) 221-228
- VRBA, M: Wirkung von Endoxan auf die Chromosomen von HeLa-Zellen
Humangenetik 4 (1967) 362-370
- WAALKENS, D.H., H.F.P. JOOSTEN, R.D.F.M. TAALMAN, J.M.J.C. SCHERES, T.D. YIH und A. HOEKSTRA: Sister chromatid exchanges induced in vitro by cyclophosphamide without exogenous metabolic activation in lymphocytes from three mammalian species
Toxicol. Letters 7 (1981) 229-232
- WADE, D.R., S.C. AIRY, und J.E. SINSHEIMER: Mutagenicity of aliphatic epoxides
Mutat. Res. 58 (1978) 217-223

- WADE, M.J., J.W. MOYER und C.H. HINE: Mutagenic action of a series of epoxides
Mutat. Res. 66 (1979) 367-371
- WELLHÖNER, H.H.: Allgemeine und systematische Pharmakologie und Toxikologie
Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg 1976
- WESTPHAL, D.: Untersuchungen zur Biotransformation des Herbizids Monolinuron CN-(4-chlorphenyl)-N'-methoxy-N'-methylharnstoff) im System der isoliert perfundierten Rattenleber
Dissertation, Freie Universität Berlin (1977)
- WHEELER, G.P.: Studies related to the mechanisms of action of cytotoxic alkylating agents: A review
Cancer Res. 22 (1962) 651-673
- WHITE, A.D. und L.C. HESKETH: A method utilizing human lymphocytes with in vitro metabolic activation for assessing chemical mutagenicity by sister chromatid exchange analysis
Mutat. Res. 69 (1980) 283-291
- WINCKLER, K., G. OBE, S. MADLE und H. NAU: Mutagenic activities of cyclophosphamide (NSC 26-27) and its main metabolites in Salmonella typhimurium, human peripheral lymphocytes and Chinese hamster ovary cells
Mutat. Res. im Druck
- WOLFF, S. (Ed.): An overview of sister chromatid exchange
J. Wiley + Sons, Inc., New York, 1982
- WULF, H.C., B. HUSUM, A.M. PLESNER und E. NIEBUHR: Distribution of SCEs in lymphocytes in persons with normal, slightly increased, and heavily increased SCEs
Mutat. Res. 125 (1984) 263-268
- YAMASAKI E. und B.N. AMES: Concentration of mutagens from urine by adsorption with the nonpolar resin XAD-2: Cigarette smokers have mutagenic urine
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 74 (1977) 3555-3559

Danksagung

Herrn Prof. Dr. Günter Obe möchte ich für seine freundliche Unterstützung bei der Anfertigung der vorliegenden Arbeit und seine Diskussionsbereitschaft herzlich danken. Sein stetes Interesse am Fortgang der Arbeit und seine ständige Förderung waren mir eine große Hilfe.

Mein Dank gilt auch Herrn Dr. Stephan Madle für die Einarbeitung in die Methodik der Rattenleberperfusion, Diskussionen und Ratschläge.

Für ihre Mitarbeit bei der Durchführung der zeitaufwendigen Versuche danke ich Frau S. Schmidt, Frau R. Jonas, Frau A. Hille und Frau U. Winkel recht herzlich, sowie Frau S. Kalweit für kollegiale Diskussionen und Ratschläge, Herrn Dipl.-Math. K.-E. Adolph für die Hilfe bei der Statistik und Herrn Dipl.-Ing. K. Lersmacher für die Anfertigung der Zeichnungen.

Der Firma CIBA-GEIGY danke ich für die Überlassung der Testsubstanz Carbamazepin, sowie für finanzielle Unterstützung.

Allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe 'Cytogenetik' am Institut für Allgemeine Genetik der FU Berlin möchte ich für ihre ständige Kollegialität und Hilfsbereitschaft danken und meinem Mann Paul-Josef und meiner Tochter Gesa für ihre Geduld und ihr Verständnis während der Durchführung dieser Arbeit.

Lebenslauf

Margit Königstein geb. Jung

1. 12. 1949	in Lich/Oberhessen geboren
April 1956	Einschulung in die Volksschule Lich
1964 - 1966	Kaufmännische Handelsschule Gießen
1966 - 1968	Lehre als Industriekaufmann
ab 1968	kaufmännische Angestellte
1971 - 1973	Hessenkolleg Wetzlar
Juni 1973	Abitur
WS 1973/74	Immatrikulation an der Freien Universität Berlin, Fachbereich Philosophie und Sozialwissenschaften
SS 1974	Wechsel zum Fachbereich Biologie der Freien Universität Berlin
WS 1976/77	Vordiplom in Biologie (Allgemeine Biologie und Genetik, Botanik, Chemie, Physik)
SS 1979	Studentischer Tutor am Institut für Allgemeine Genetik, FU-Berlin
- WS 1981/82	
WS 1981/82	Diplom in Biologie; Hauptfach: Allgemeine Biologie und Genetik
WS 1981/82	Beginn der Doktorarbeit am Institut für Allgemeine Genetik, FU-Berlin
seit Juli 1983	Wissenschaftliche Mitarbeiterin im Rahmen eines Forschungsprojekts 'Arzneimittelprüfung an hämopoetischen Stammzellen in vitro und in vivo' am Institut für Pharmazie an der FU-Berlin

Ich bin seit 1974 verheiratet und habe ein Kind.

